

Klinische Studie und experimentelle Untersuchungen zur
nicht-viralen Gentherapie solider Tumoren

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Dipl. Biol. Dennis Kobelt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. W. Uckert
2. PD Dr. W. Walther
3. Prof. Dr. H. Lage

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2012

Diese Arbeit wurde angefertigt am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch unter der Anleitung von PD Dr. Wolfgang Walther in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Dr. h.c. Peter M. Schlag.

„Die Vernunft ist ein Licht.
Davon will und soll die Natur erleuchtet, jedoch nicht in Brand gesteckt werden.“

Giacomo Leopardi

Inhaltsverzeichnis	
INHALTSVERZEICHNIS	1
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	5
ZUSAMMENFASSUNG	7
1 EINLEITUNG	9
1.1 ENTWICKLUNG UND KONZEPTE DER GENTHERAPIE	9
1.2 VEKTOREN UND APPLIKATIONSSYSTEME	12
1.2.1 <i>Chemische Gentransfersysteme</i>	13
1.2.2 <i>Physikalische Gentransfersysteme</i>	16
1.2.2.1 Hydrodynamischer Gentransfer.....	17
1.2.2.2 Elektroporation	18
1.2.2.3 Ballistischer Gentransfer	19
1.2.2.4 Gentransfer mit Hilfe von Ultraschall	20
1.2.2.5 Gentransfer mit Hilfe magnetischer Kräfte.....	21
1.2.2.6 Gentransfer mit Hilfe von Aerosolen	23
1.2.2.7 Jet-Injektion	23
1.3 NICHT-VIRALE VEKTORSYSTEME.....	26
1.3.1 <i>Minicircle</i>	26
1.3.2 <i>MIDGE</i>	28
1.3.3 <i>Transposon/ Transposase-basierte Vektoren</i>	30
1.4 DER HUMANE TUMORNEKROSEFAKTOR-ALPHA	31
1.5 DER ZELLTOD DURCH APOPTOSE UND NEKROSE	33
ZIELSTELLUNG	36
2 MATERIAL UND METHODEN.....	37
2.1 VEKTOREN, VEKTORHERSTELLUNG	37
2.1.1 <i>MIDGE</i>	37
2.1.1.1 MIDGE-Synthese des Sleeping Beauty (SB) Transposase/Transposon- Systems.....	38
2.1.2 <i>Minicircle</i>	39
2.1.3 <i>pCMVβ</i>	39
2.2 LAGERUNG	40
2.3 ZELLKULTUR	40
2.3.1 <i>Gentransfer in vitro</i>	41
2.3.2 <i>In vitro Vindesinbehandlung</i>	42

2.3.3	<i>MTT-Assay</i>	42
2.3.4	<i>LDH-Assay</i>	42
2.3.5	<i>Caspase-Glo Apoptose Assay</i>	43
2.4	EXPRESSIONSANALYSEN AUF RNA- UND PROTEINEBENE	43
2.4.1	<i>RNA-Isolation</i>	43
2.4.2	<i>Reverse Transkription</i>	44
2.4.3	<i>Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) für den mRNA-Nachweis</i>	44
2.4.4	<i>Luziferase Assay</i>	45
2.4.5	<i>FACS Analyse</i>	46
2.4.6	<i>hTNFα Elisa</i>	46
2.4.7	<i>Protein-Isolation</i>	47
2.4.8	<i>Proteinquantifizierung</i>	47
2.4.9	<i>Western Blot</i>	48
2.4.10	<i>X-Gal-Färbung</i>	48
2.4.11	<i>Immunhistochemischer β-Galactosidase Nachweis</i>	49
2.5	VEKTORQUANTIFIZIERUNG	49
2.5.1	<i>Vektor-Isolation</i>	49
2.5.1.1	DNA-Isolation aus Patientenmaterial	49
2.5.1.2	DNA-Isolation aus Blut	50
2.5.1.3	DNA-Isolation aus Xenograft-Tumoren.....	50
2.5.1.4	DNA-Isolation aus Zellkernen	50
2.5.2	<i>Quantitative Real-Time PCR (qPCR) für den Vektornachweis</i>	50
2.5.3	<i>DNA Labeling</i>	51
2.6	KLINISCHE PHASE I GENTRANSFERSTUDIE	52
2.6.1	<i>Patienten</i>	52
2.6.2	<i>Studienprotokoll</i>	52
2.6.3	<i>Molekularbiologische Untersuchungen</i>	53
2.7	MAUSMODELLE	54
2.7.1	<i>Tumormodell</i>	54
2.7.2	<i>Intratumorale Jet-Injektion</i>	54
2.7.3	<i>In vivo Imaging</i>	55
2.8	PRÄKLINISCHE TOXIKOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DES MIDGE-VEKTORS.....	55
3	ERGEBNISSE	56
3.1	KLINISCHE GENTRANSFER-STUDIE	56
3.1.1	<i>Patienten</i>	56
3.1.2	<i>Plasmid-DNA Verteilung in den Tumoren</i>	57

3.1.3	<i>LacZ-Nachweis auf mRNA und Proteinebene</i>	60
3.1.4	<i>Funktionaler LacZ-Nachweis und LacZ-Verteilung im Tumorgewebe</i>	62
3.1.5	<i>Systemischer Vektorabbau im Blut</i>	63
3.1.6	<i>Zusammenfassung Klinische Gentransfer-Studie</i>	65
3.2	VERGLEICHENDE EXPRESSIONSANALYSEN NEUER MINIMALISTISCHER VEKTOREN	65
3.2.1	<i>Zusammenfassung Vergleichende Expressionsanalysen der minimalistischen Vektoren</i>	69
3.3	MECHANISMUS DER OPTIMISIERTEN EXPRESSION MINIMALISTISCHER VEKTOREN	69
3.3.1	<i>Vergleich der Gentransfereffizienz</i>	69
3.3.2	<i>Qualitative und quantitative Analyse der Vektorakkumulation</i>	71
3.3.3	<i>Quantitative Analyse der Transgenexpression auf mRNA-Ebene</i>	74
3.3.4	<i>Zusammenfassung Mechanismus der optimierten Expression minimalistischer Vektoren</i>	76
3.4	IN VITRO UNTERSUCHUNGEN DER MIDGE-VERMITTELTEN hTNF α -EXPRESSION	76
3.4.1	<i>Vergleich der in vitro hTNFα-Expression</i>	77
3.4.2	<i>In vitro Analyse der hTNFα-vermittelten Chemosensitivierung</i>	78
3.4.3	<i>Mechanismus der erhöhten Vindesinzytotoxizität durch Chemosensitivierung mit hTNFα-Gentransfer</i>	81
3.4.3.1	<i>Nekrosenachweis durch Analyse der LDH-Freisetzung</i>	81
3.4.3.2	<i>Nachweis von Apoptose durch Analyse der Caspase-Aktivierung</i>	82
3.4.4	<i>Zusammenfassung der in vitro Untersuchungen der MIDGE-vermittelten hTNFα-Expression</i>	84
3.5	IN VIVO UNTERSUCHUNGEN DES THERAPEUTISCHEN POTENTIALS DER MIDGE-VEKTOREN	85
3.5.1	<i>Expression des therapeutischen Transgens hTNFα in vivo</i>	85
3.5.2	<i>Zeit- und Dosisabhängigkeit der intratumoralen und systemischen Verteilung des MIDGE-Vektors nach Jet-Injektion</i>	87
3.5.3	<i>Kombination von hTNFα-Gentransfer mit Chemotherapie in vivo</i>	88
3.5.4	<i>Präklinische Toxizitätsuntersuchung des MIDGE-Vektors</i>	90
3.5.5	<i>Zusammenfassung in vivo Untersuchungen des therapeutischen Potentials der MIDGE-Vektoren</i>	90
3.6	AUSBLICK	91
3.6.1	<i>Stabile Expression mit Hilfe der Sleeping Beauty Transposase</i>	91
3.6.1.1	<i>Generierung der Sleeping Beauty MIDGE-Vektoren</i>	91
3.6.1.2	<i>In vitro Gentransfer der Transposase/Transposon- tragenden Vektoren</i>	92
3.6.2	<i>Weitere Optimierung des Gentransferprotokolls</i>	95

3.6.3 Zusammenfassung Ausblick.....	97
4 DISKUSSION	98
4.1 KLINISCHE GENTRANSFER-STUDIE	98
4.2 VERGLEICHENDE EXPRESSIONSANALYSEN NEUER MINIMALISTISCHER VEKTOREN 100	
4.3 MECHANISMUS DER OPTIMIERTEN EXPRESSION MINIMALISTISCHER VEKTOREN ..	101
4.4 <i>IN VITRO</i> UNTERSUCHUNGEN DER MIDGE-VERMITTELTEN hTNF α -EXPRESSION	103
4.5 <i>IN VIVO</i> UNTERSUCHUNGEN DES THERAPEUTISCHEN POTENTIALS DER MIDGE- VEKTOREN	105
4.6 AUSBLICK	107
LITERATURVERZEICHNIS	110
ERKLÄRUNG	141
PUBLIKATIONEN	142
DANKSAGUNG	146

Verzeichnis der Abkürzungen

AAV	adenoassoziertes Virus
ANOVA	analysis of variance
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
ccc	covalently closed circular
cDNA	copy-DNA oder complementary DNA
CF	Cystische Fibrose
CMV	Cytomegalievirus
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankungen
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid Hydrat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOSPA	N,N-dimethyl-N-[2-(spermin-ecarboxamido)ethyl]-2,3-bis(dioleoyloxy) -1-propaniminium pentahydrochlorid
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chlorid
dSLIM	double Stem Loop Immunomodulator
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMEA	European Medicines Agency
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
G6PDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GDEPT	gene-directed enzyme prodrug therapy
GFP	grün fluoreszierendes Protein
gp	Glycoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hTNF α	humaner Tumornekrosefaktor-alpha
IC50	halbmaximale inhibitorische Konzentration (50% Inhibition)
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IR	inverted repeats
i.v.	intravenous
kb	Kilobasenpaare

LMO2	LIM domain only 2 (Genbezeichnung)
Luc	Luziferase
MCB	Master Cell Bank
MIDGE	minimalistische immunologisch definierte Genexpression
NLS	nuclear localization signal (Kernlokalisationssequenz)
ORI	origin of replication (Replikationsursprung)
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
PAMAM	Polyamidoamin
PBS	Phosphate buffered saline
(q)PCR	(quantitative) Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PLL	Poly(L-Lysin)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
(m)RNA	(messenger) Ribonucleic acid
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Media 1640
SB	Sleeping Beauty
S/MAR	scaffold/matrix attachment region
s.c.	subkutan
SV40	Simian vacuolating virus 40
RT	Raumtemperatur
(q)RT-PCR	(quantitative) Reverse Transcription-PCR
TBS(T)	Tris buffered saline (Tween)
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WAS	Wiskott-Aldrich Syndrom
WCB	Working Cell Bank
X-SCID	X-linked severe combined immunodeficiency

Zusammenfassung

Krebs gehört zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Zu den Hoffnungsträgern für die Behandlung maligner Tumore gehört die Gentherapie. Unter Verwendung verschiedener Konzepte konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung von Tumoren durch die Gentherapie möglich ist. Nun müssen diese Konzepte und Behandlungsstrategien in die Klinik gebracht werden.

Eine Säule der Gentherapie ist die Verwendung von viralen Vektoren für den Gentransfer. Hier gibt es große Sicherheitsbedenken aufgrund der Immunantwort gegenüber viralen Proteinen und der Möglichkeit der insertionellen Mutagenese. Die nicht-virale Gentherapie dagegen gilt als sicherer. Allerdings stellt die geringe Gentransfereffizienz eine Hürde für den klinischen Einsatz dar.

Für den nicht-viralen Gentransfer sind sowohl Vektor als auch Gentransfertechnologie von entscheidender Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gentransfereffizienz und Sicherheit der Jet-Injektion in einer klinischen Phase I Gentransferstudie mit Hilfe des Swiss-Injektors (EMS Medical, Nyon, Schweiz) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Technologie sicher klinisch angewendet werden kann. Die Gentransfereffizienz wurde auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Als Sicherheitsparameter wurden die systemische Verteilung und der Abbau im Blut untersucht. Diese Studie zeigte, dass die Sicherheit der Vektoren und vor allem die Gentransfereffizienz weiter optimiert werden müssen.

Ausgehend von den Ergebnissen der klinischen Phase I Studie sollten Sicherheit und Effizienz des Gentransfers erhöht werden. Um einen optimierten Vektor zu finden, wurden verschiedene nicht-virale, minimalistische Vektoren (Minicircle, MIDGE) miteinander und mit ihren parentalen Plasmiden verglichen. In Reporter-genassays stellte sich der MIDGE-Vektor als den zirkulär geschlossenen Vektoren überlegen dar. Es konnte gezeigt werden, dass dafür nicht die Vektorverteilung, die Vektormenge oder die Gentransfereffizienz verantwortlich sind, sondern eine effizientere Transkription. Da der MIDGE-Vektor die beste Transgenexpression zeigte, wurde dieser Vektor in den weiteren Arbeiten für die Expression des humanen Tumornekrosefaktor-alpha eingesetzt.

In der Klinik wurde hTNF α bereits zur Therapie von malignen Tumoren wie dem malignen Melanom eingesetzt. Das Chemotherapeutikum Vindesin ist für die klinische Anwendung zugelassen und wird für die Behandlung des malignen Melanoms eingesetzt. In Vorbereitung der klinischen Anwendung des MIDGE-Vektors wurde die

Kombination von hTNF α -Gentransfer und Vindesin-Chemotherapie untersucht. Auch bei Verwendung des therapeutischen Transgens zeigte der MIDGE-Vektor eine erhöhte *in vitro* Genexpression auf Proteinebene. Die Vektor-vermittelte hTNF α -Expression führte *in vitro* im MTT-Vitalitätsassay zu einer erhöhten Zytotoxizität der Vindesinbehandlung. Die Expression von hTNF α führte in Kombination mit Vindesin zu einer schnelleren Aktivierung von Caspasen als bei der Vindesinbehandlung allein. Dabei wurde kein LDH freigesetzt. Dies weist darauf hin, dass die Zellen im Vergleich zu den Einzeltherapien bei Kombination von hTNF α -Gentransfer und Vindesin schneller und verstärkt die Caspasen aktivieren und so die Apoptose einleiten.

Auch *in vivo* konnte die verbesserte hTNF α -Genexpression des MIDGE-Vektors nach Jet-Injektion auf Protein- und mRNA-Ebene gezeigt werden. Dies führte in Kombination mit Vindesin zu einem signifikant reduzierten Tumorwachstum. Durch Analyse der systemischen Vektorverteilung im Blut und in den Organen sowie in einer präklinischen toxikologischen Untersuchung konnte die sichere Anwendung des MIDGE-Vektors bestätigt werden.

Abschließend wurden Möglichkeiten aufgezeigt, über die Optimierung des Vektors hinaus den nicht-viralen Gentransfer weiter zu verbessern. Hierzu konnte in ersten Experimenten gezeigt werden, dass die MIDGE-Vektortechnologie mit dem Sleeping Beauty Transposon/Transposase-System kombiniert werden kann. Weiterhin wurde *in vivo* mit Hilfe eines Reportergens gezeigt, dass die Anwendung zweier Gentransfertechnologien, der Jet-Injektion und der Elektroporation, den Gentransfer weiter verbessert.

1 Einleitung

1.1 Entwicklung und Konzepte der Gentherapie

Das Konzept der Gentherapie wurde bereits kurz nach der Strukturaufklärung der DNA in den 60iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts formuliert. Lederberg und Tatum erkannten bereits in dieser Zeit, dass „die Kontrolle der Nukleotidsequenzen“ und das Verwenden von Viren zu einer somatischen Therapie genetischer Erkrankungen führen können [1, 2]. Dies geschah in einer Zeit, in der Gene als kodierende Einheiten bekannt, aber noch nicht isoliert waren. In den folgenden Jahren wurden die benötigten Technologien wie Zell- und Viruskultur, molekulares Klonieren (z.B. Entdeckung der Restriktionsendonukleasen und Ligasen), PCR und Sequenzierung entwickelt, die die Möglichkeit eröffnen, gezielt und gesteuert Vektoren zu generieren und Nukleinsäuren mit wenigen Basen Größe bis hin zu einigen Kilobasen Größe in Zellen und Gewebe einzubringen.

Mitte der 80iger Jahre konnte zunächst mit Hilfe von Retroviren *in vivo* gezeigt werden, dass der Gentransfer möglich ist. Heute ist die Gentherapie nicht mehr nur auf virale Vektoren, wie z.B. Adeno-, Retro- oder adenoassoziierte Viren, beschränkt, sondern es finden auch nicht-virale Vektoren wie Plasmide, siRNAs oder shRNAs eine breite Verwendung, obwohl sie bisher eine begrenzte Transfereffizienz gezeigt haben. Der Grund für die Entwicklung nicht-viraler Vektoren ist, dass der sehr hohen Gentransfereffizienz der viralen Vektoren große Sicherheitsbedenken wie insertionelle Mutagenese, Onkogenaktivierung, starke Immunogenität oder eine Verbreitung in die Umwelt gegenüber stehen. Diese Risiken haben bereits zu Todesfällen und schweren Therapiezwischenfällen, wie der Induktion von Leukämie, geführt. Alle bisher beschriebenen Todesfälle und schweren Komplikationen in Zusammenhang mit einer Gentherapie traten bei der Verwendung von viralen Vektoren auf. Diese Zwischenfälle stellen bedauerliche Rückschläge dar, mit denen im Verlauf von neuen und risikobehafteten Behandlungen allerdings immer wieder zu rechnen ist. Auf der anderen Seite sind diese schweren Komplikationen in einer kleinen, relativ gut zu charakterisierenden Gruppe von Patienten aufgetreten. Sie traten immer in den Hochdosisgruppen (Todesfälle aufgrund starker Immunreaktionen) oder bei Verwendung hämatopoetischer Stammzellen (Entwicklung von Leukämie nach viraler Integration nahe dem LMO2-Lokus) junger Patienten auf [3, 4, 5, 6, 7]. Einer der verstorbenen Patienten hätte aufgrund seines Gesundheitszustandes nicht an der Studie teilnehmen dürfen, beim anderen Patienten konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die Virusapplikation Ursache für den Tod war. Das Risiko einer

Genaktivierung kann durch die Verwendung optimierter Vektoren, wie der selbst-inaktivierenden SIN-Vektoren, vermindert werden. Diese SIN-Vektoren besitzen in der 3'-LTR eine Deletion, durch die die transkriptionsaktivierende Funktion dieser Region verloren geht. Die insertionelle Mutagenese wurde sehr selten in präklinischen Experimenten beobachtet [8, 9]. Trotz der bestehen Gefahren zeigt die überwiegende Mehrzahl der klinischen Studien in den Phasen I-III, dass gentherapeutische Eingriffe ohne schwere Komplikationen durchgeführt werden können. Die Gentherapie stellt also weiterhin eine erfolgversprechende Therapieform der Zukunft dar, vor allem für die Behandlung von Erkrankungen, die auf anderem Weg nur begrenzt oder gar nicht behandelbar wären. Dazu gehören vererbte (z. B. OTC-Defizienz, Faktor VIII-Defizienz, X-SCID) und somatische Gendefekte (z. B. Krebs), aber auch Infektionskrankheiten wie HIV/AIDS. Speziell für die Krebsgentherapie haben sich verschiedene Konzepte etabliert. Sie unterscheiden sich durch den Mechanismus, der therapeutisch angewandt werden soll (z.B. Immunotherapie, Chemoprotektion, Tumorsuppression, Anti-Angiogenese, Enzyersatz, Suizidgentherapie). In der Krebstherapie werden häufig Prodrug-aktivierende (GDEPT, gene-directed enzyme-prodrug therapy) oder Suizidkonzepte verfolgt, um den Tumor direkt anzugreifen. GDEPT ist dabei ein Teilkonzept der Suizidgentherapie. Für die GDEPT werden Gene von Enzymen verwendet, die wenig toxische Prodrugs in ihre aktive, stark zytotoxische Form überführen können. Eine lokale Expression des Enzyms im Tumor führt dann zu einer für den Patienten besser zu tolerierenden Therapie, da die stark toxisch wirkende Substanz nur im Tumor generiert wird. Im Rahmen von Enzyersatztherapien werden verloren gegangene Enzymaktivitäten (Tumorsuppressorgene) wieder in die Zelle eingebracht. Hier ist das Ziel, das nicht korrekt funktionierende bzw. fehlende Genprodukt zu ersetzen. Hier stellen Menge und Expressionsregulation große Probleme dar. Auch regulatorische Strategien werden für verschiedene Indikationen erforscht. So können in der Tumorthherapie Suppressorgene aktiviert oder Resistenz- und Onkogene supprimiert werden, um das Wachstum und die Ausbreitung des Tumors zu unterdrücken [10, 11, 12].

Um genetisches Material in die Zellen zu transportieren, werden Vektoren und Gentransfertechnologien benötigt. Neben viralen Vektoren stehen verschiedene nicht-virale Vektoren und Transfertechnologien zur Verfügung (Tabelle 1). Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Etablierung und Optimierung einer nicht-viralen Gentherapie für solide Tumoren, sodass wichtige nicht-virale Vektoren im Folgenden vorgestellt werden.

Gentransfermethode	Vektor	Eigenschaften
Chemischer Gentransfer	Komplexe aus DNA, RNA, Oligonukleotiden	<ul style="list-style-type: none"> -Lipide schützen Nukleinsäure vor Abbau -teilweise toxisch -protokollabhängig hohe Gentransfer-effizienzen in vielen Geweben möglich -Gentransfer außerhalb des Zielgewebes möglich
Nadelinjektion	Nackte DNA	<ul style="list-style-type: none"> -geringe Gentransfereffizienz -vor allem für Gentransfer in Muskelgewebe geeignet -lokaler Gentransfer mit geringer systemischer Belastung
Hydrodynamischer Gentransfer	nackte DNA, RNA, Oligonukleotide	<ul style="list-style-type: none"> -invasive Methode -hohe Gentransfereffizienz -gut für Lebergentransfer geeignet -Gentransfer außerhalb des Zielgewebes möglich
Elektroporation	nackte DNA, RNA, Oligonukleotide	<ul style="list-style-type: none"> -breites Anwendungsspektrum -protokollabhängig hohe Gentransfereffizienzen möglich -lokaler Gentransfer mit geringer systemischer Belastung
Ballistischer Gentransfer	meist mit DNA beladene Metall-Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> -geringe Eindringtiefe ins Gewebe -gut für Immunisierungen geeignet -lokaler Gentransfer mit geringer systemischer Belastung
Ultraschall	nackte Nukleinsäuren oder Lipidkomplexe	<ul style="list-style-type: none"> -abhängig von Kontrastmitteln -Anwendung von Ultraschall klinisch gut etabliert -Gentransfer außerhalb des Zielgewebes möglich (Komplexe)
Magnetofektion	Magnetische Nanopartikel mit nicht-viralen oder viralen Vektoren	<ul style="list-style-type: none"> -ohne weitere Technologien kein Gentransfer -Konzentration der Vektoren im Zielgewebe
Aerosole	Komplexe aus chem. Vektoren und Nukleinsäuren	<ul style="list-style-type: none"> -Gentransfer in den Atemwegen -Toxizität durch chemischen Gentransfer -Gentransfer außerhalb des Zielgewebes möglich
Jet-Injektion	nackte DNA, RNA, Liposom-Komplexe, AAV	<ul style="list-style-type: none"> -geringe Toxizität, kaum Gewebeschäden -breites Anwendungsspektrum -gute Verteilung im Gewebe -lokaler Gentransfer mit geringer systemischer Belastung

Tabelle 1: Eigenschaften physikalischer Gentransfermethoden

1.2 Vektoren und Applikationssysteme

Für die Gentherapie ist eine Vielzahl viraler und nicht-viraler Vektoren entwickelt worden. Mit Hilfe der viralen Vektoren konnten bisher die größten Erfolge erzielt werden. Zu ihnen gehören die Adeno- und γ -Retroviren, aber auch einige Vertreter anderer Virusfamilien (Lenti-, adenoassoziierte und Herpesviren) werden für die somatische Gentherapie bereits in klinischen Studien eingesetzt [13]. Daneben werden weitere Viren experimentell für den *in vivo* Gentransfer untersucht, dazu gehören unter anderem Pox-, Vaccinia- oder Hepatitis B Viren [14, 15, 16]. Der Nutzung viraler Vektoren stehen jedoch große Sicherheitsbedenken gegenüber, sodass auch zahlreiche nicht-virale Vektoren und Applikationssysteme entwickelt wurden. Einige der nicht-viralen Vektoren konnten bereits in zahlreichen klinischen Studien erfolgreich eingesetzt werden. Etwa 18% aller klinischen Gentherapie-Studien nutzen z.B. nackte DNA als nicht-viralen Vektor.

Im Gegensatz zu den chemischen Transfermethoden (z.B. kationische Liposomen und Polyplexe) sind die meisten physikalischen Gentransfermethoden selbst nicht toxisch, können aber technologiebedingt zu ausgedehnten Gewebeschäden führen (Thermoablation, mechanische Schäden, Komplikationen durch Blutungen). Ein großer Vorteil physikalischer Methoden für den Gentransfer ist die Möglichkeit eines lokal stark begrenzten und damit gerichteten Gentransfers. Es werden nur Zellen in Arealen transfiziert, die dem Gentransfer ausgesetzt sind. Methoden wie die Jet-Injektion sind dabei auf eher kleine Areale begrenzt, die durch mehrfache Applikation vergrößert werden können, während Methoden wie der hydrodynamische Gentransfer eher große Organe und Gewebeareale transfizieren können. Dennoch ist selbst beim hydrodynamischen Gentransfer eine gute lokale Kontrolle möglich. Der lokale Gentransfer mit Hilfe chemischer und viraler Vektoren ist nicht leicht zu erreichen. Es kommt oft zu einer systemischen Verteilung des Vektors. So können Zellen außerhalb des gewünschten Areals mit dem aktiven Vektor in Kontakt kommen. Dies kann zu unerwünschten Nebeneffekten führen. Neben der Verbesserung der eigentlichen Transfersysteme spielt hier auch die Optimierung der Vektoren eine wesentliche Rolle. In diesem Zusammenhang wird kontinuierlich an weiteren Anpassungen gearbeitet, um klinisch relevante Transgenexpressionen zu erzielen. Durch Optimierung von Größe und Struktur der verwendeten Vektoren kann der Transfer sowie die Sicherheit der Gentherapie und damit die klinische Anwendbarkeit verbessert werden. Da kein Vektor für jede Anwendung gleichermaßen anwendbar ist, muss aus dem Pool verschiedener Vektoren und Applikationssysteme (chemisch oder physikalisch) sorgfältig eine

Kombination ausgewählt und optimiert werden, die für das angestrebte Ziel den größten Erfolg verspricht [17]. Verschiedene chemische und physikalische Gentransfermethoden werden wegen ihrer Bedeutung für den nicht-viralen Gentransfer im Folgenden kurz vorgestellt.

1.2.1 Chemische Gentransfersysteme

Die chemischen Gentransfersysteme gehören zu den am weitesten verbreiteten Methoden für den Gentransfer. Sie werden sehr häufig für den *in vitro* Gentransfer benutzt. Es ist darüber hinaus möglich, sie in Tiermodellen (Maus, Ratte) sowie klinisch einzusetzen [18, 19, 20]. Oft wird der chemische Gentransfer als Lipofektion bezeichnet, vor allem, wenn Lipide als Vektor verwendet werden [21]. Sie haben auch eine gewisse klinische Verbreitung erfahren. Im Jahr 2010 wurden über 100 klinische Studien durchgeführt, in denen die Lipofektion als Gentransfermethode verwendet wurde. Ziel des chemischen Gentransfers ist es, die DNA in eine Form zu bringen, sodass sie von den Zellen über endozytotische Prozesse aufgenommen werden kann. Darüber hinaus sollen die Vektoren vor nukleolytischem Abbau, vor allem *in vivo*, geschützt werden. Dies ist vor allem außerhalb der Zelle wichtig, aber auch intrazellulär findet eine Degradation (z.B. im Endosom) statt. Dennoch müssen die verwendeten Gentransfersysteme die DNA effizient freilassen, zum einen, damit die DNA die Endosomen verlassen kann, zum anderen, um den Transport in den Zellkern und die Transkription nicht zu behindern. Eine der ersten chemischen Transfermethoden war die Kalzium-Phosphat-Präzipitation [22, 23]. Die DNA bildet dabei Präzipitate, die von den Zellen über Endozytose aufgenommen werden. Heute werden unter anderem kationische Lipide, Polymere von Aminosäure- und Zuckerderivaten und Dendrimere verwendet (Abbildung 1). Daneben gibt es außerdem die Möglichkeit, Peptide von z.B. viralen Proteinen für den Gentransfer einzusetzen. Werden verschiedene Gentransfermethoden kombiniert, wie bei der Aerosolbildung oder der Magnetofektion, verschwimmen die Grenzen zwischen physikalischem und chemischem Gentransfer. Auch Nanopartikel wie Nanoröhren und Hydrogele werden für den Gentransfer eingesetzt [24].

Zu den als erste eingesetzten nicht-viralen Vektoren gehören die kationischen Lipide. Dazu gehören unter anderem DOTMA, DOPE oder DOSPA, die unter den Namen Lipofectin bzw. Lipofectamine kommerziell erhältlich sind (Abbildung 1 A, 1 B) [24]. Alle kationischen Lipide bestehen aus drei funktionellen Gruppen, einer positiv geladenen Kopfgruppe, einem Linker und einer hydrophoben Gruppe [24]. Jede dieser

Komponenten kann durch zahlreiche Modifikationen verändert werden, um die Eigenschaften des Lipids wie Stabilität, Effizienz und Toxizität anzupassen [24]. Zu den großen Problemen des Lipid-basierten Gentransfers gehören die zum Teil hohe Toxizität bei geringer Spezifität und häufig auch die Empfindlichkeit gegenüber Serumkomponenten. Die Varianzen in der Komplexbildung während der Herstellung sind vor allem klinisch relevant [25, 26]. Dies steht einem systemischen Einsatz in klinischen Studien entgegen. Die kationischen Lipide werden häufig mit neutralen Helferlipiden wie DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) gemischt. Diese Helferlipide unterstützen die Komplexbildung mit der DNA, das Verlassen des Endosoms und können auch ein gewisses Zelltargeting (z.B. durch Rezeptorbindung) bewirken [27, 28, 29].

Eine weitere große Gruppe der synthetischen Vektoren sind die Polymer-basierten Vektoren. Zu dieser Gruppe gehören zahlreiche Moleküle wie das weit verbreitete Poly(L-Lysin) (PLL) und Polyethylenimin (PEI) (Abbildung 1 C, 1 D) [30, 31]. Aber auch weniger bekannte Polymere wie Carbohydrat-basierte Polymere (Chitosan, Dextran, β -Cyclodextrin), lineare Poly(amido-amine) (PAA) sowie verschiedene Andere gehören in diese Gruppe [24]. Auch hier wurden in den letzten Jahrzehnten große Anstrengungen unternommen, um die Gentransfereffizienz zu erhöhen. Für Veränderungen der physikochemischen und biologischen Eigenschaften wurden unter anderem die Strukturen und Zusammensetzungen der Polymere weitgehend untersucht. Ziel war es, die jeweils bestehen Probleme zu lösen. So besitzt PLL keine Pufferkapazität unter physiologischen Bedingungen, sodass das Verlassen der Endosomen nicht durch das Transportvehikel unterstützt wird. Hierfür wurden z.B. PLL-PEG (PLL-Polyethylenglykol) Kopolymere entwickelt. Sie besitzen eine gewisse Pufferkapazität und verringerte Toxizität [32]. PEI und seine Derivate gelten immer noch als „Goldstandard“ unter den synthetischen Vektoren. Es ist als lineare und verzweigte Form bekannt, die wiederum zahlreiche Modifikationen erfahren haben. Vor allem lineares PEI ist kommerziell erhältlich (z.B. jetPEI, *in vivo* PEI etc.). Ein wesentlicher Bestandteil der PEI-Wirkung ist seine hohe Pufferkapazität. Sie sorgt dafür, dass die eigentlichen DNA-Vektoren nicht in den lysosomalen Weg gelangen, sondern schon vorher aus den Endosomen entlassen werden. Dies wird als Protonenschwammtheorie (proton sponge theory) bezeichnet [33].

Eine weitere Gruppe chemischer Transfervehikel sind die Dendrimere. Sie sind stark verzweigte Polymere (griech. Dendros, der Baum, Abbildung 1 E). Ihre Synthese geht von einem Verzweigungskern aus. Die verschiedenen Zweige bestehen aus repetitiven Einheiten, die eine radiale Symmetrie aufweisen. Für die Anwendung als

Gentransfervehikel sind Polyamidoamin Dendrimere (PAMAM) am weitesten verbreitet (Abbildung 1 E). Sogenannte „Dendriplexe“ (DNA-Dendrimer Komplexe) aus PAMAM wurden 1993 erstmals eingesetzt [34]. Die Verbesserung des Gentransfers beruht auf drei Mechanismen: Wie die meisten synthetischen Gentransfersysteme schützen sie die DNA vor Degradation [35]. Daneben unterstützen sie die Aufnahme in die Zellen, da sie aufgrund ihres Aufbaus strukturelle Veränderungen in der Zellmembran verursachen [36]. Darüber hinaus unterstützen sie ähnlich wie PEI, das Freilassen der DNA aus den Endosomen, bevor diese zu Lysosomen werden. Dies liegt an der hohen Pufferkapazität von PAMAM (Protonenschwamm). Auch die Dendrimere wurden stark modifiziert, um ihre Eigenschaften zu optimieren. Dazu gehören Zytotoxizität (durch Neutralisierung der Oberfläche), Komplexbildung (Auflockerung der Oberflächenstruktur), Zellbindung (Modifikation mit membrandestabilisierenden Peptiden oder Lipiden), Freisetzung aus den Endosomen (Modifikation mit Cyclodextrin) und Targeting (Modifikation mit Liganden für Tumorantigene) [37, 38, 39, 40, 41]. Neben den Polyamidoamin-Dendrimern sind Polypropylenimin- und Poly(L-Lysin)-Dendrimere seit längerer Zeit bekannt. Neuartige Dendrimere sind Phosphorenthaltende Dendrimere und Carbosilan Dendrimere. Diese Moleküle sind aufgrund ihrer erhöhten Zytotoxizität, schwieriger Synthesewege und ihrer Neuartigkeit bisher weniger weit verbreitet als PAMAM [24].

Auch Peptide können für den Gentransfer eingesetzt werden. Neben einer hohen Effizienz bieten sie die Möglichkeit bestimmte Zellen gezielt zu transfizieren. Es werden Peptide verwendet, die hauptsächlich aus basischen Aminosäuren bestehen. Man unterteilt diese Zell-penetrierenden Peptide in zwei Klassen, lysinreiche Peptide und argininreiche Peptide [42]. Kleine Oligonukleotide, z.B. siRNAs, können mit den Peptiden kovalent verbunden werden. Große Vektoren, u.a. Plasmide, werden mit Hilfe elektrostatischer Wechselwirkungen, ähnlich denen der Lipid-basierten Transfermoleküle, mit den Peptiden beladen [24]. Es finden Peptide aus den Proteinen Tat und dem Antennapediaprotein von *D. melanogaster* Verwendung [43, 44]. Aber auch synthetische Peptide wie das MPG Peptid (Fusion aus Sequenzen von HIV gp41 und dem großen T-Antigen von SV40) und Transportan (abgeleitet von einem Protein aus einem Wespengift) sind bekannt [45, 46]. Außer für Tat-basierte Peptide werden nicht-endozytische Prozesse als Aufnahmemechanismus beschrieben (Mikropinozytose, Mizellenbildung, Porenbildung) [24].

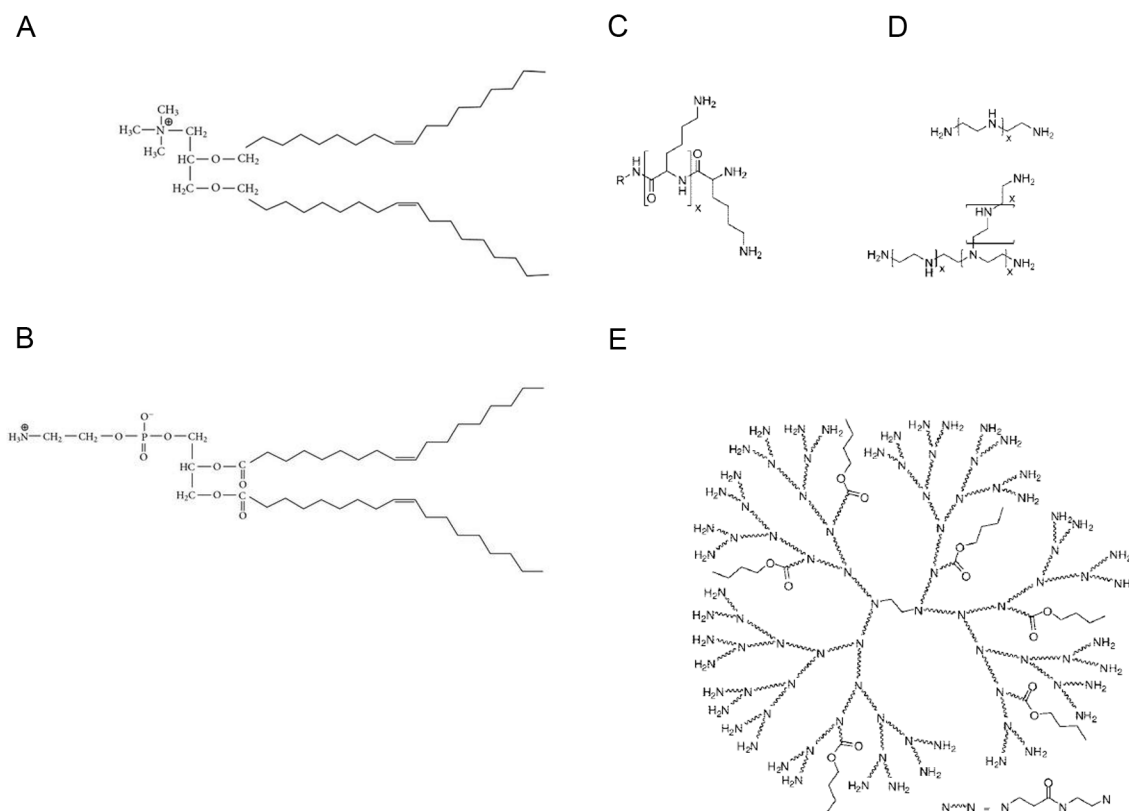


Abbildung 1: Strukturformeln weit verbreiteter synthetischer Vektoren

- A) N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA)
- B) das Helferlipid Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE)
- C) Poly(L-Lysin) (PLL)
- D) lineares und verzweigtes Polyethylenimin (PEI)
- E) ein Polyamidoamin Dendrimer (PAMAM)

1.2.2 Physikalische Gentransfersysteme

Physikalische Gentransfersysteme nutzen physikalische Kräfte, wie z. B. mechanische oder elektrische, um die nicht-viralen Vektoren durch die Zellmembran in die Zelle zu transportieren [47]. Häufig werden dabei transiente Poren in der Membran induziert, durch die große Moleküle wie DNA aufgrund passiver Diffusion oder weitere physikalische Vorgänge (z.B. Elektrophorese während der Elektroporation) in das Zellinnere gelangen [48, 49, 50]. Weiterhin können endo- und pinozytische Prozesse an der Vektoraufnahme beteiligt sein [50, 51, 52]. Innerhalb der Zelle werden die Vektoren entlang des Zytoskeletts in den Zellkern transportiert, oder die Struktur des Zytoskeletts muss so weit verändert werden, dass die Diffusion von großen Vektoren möglich wird [52, 53, 54]. Die Aufnahme in den Zellkern erfolgt durch die Kernporen [55]. Dieser Vorgang kann durch Bindestellen für Transkriptionsfaktoren oder „Nuclear Localization Sequences“ (NLS) begünstigt werden [54, 56, 57]. In mitotischen Zellen kann eine Aufnahme der Vektor-DNA auch während der Mitose

erfolgen. Diese Prozesse sind allerdings nicht vollständig aufgeklärt. Zu den physikalischen Transfertechnologien gehören z.B. der hydrodynamische Gentransfer, die Elektroporation, der ballistische Gentransfer usw., die im Folgenden detaillierter vorgestellt werden.

1.2.2.1 Hydrodynamischer Gentransfer

Seit Ende der 90iger wird der hydrodynamische Gentransfer eingesetzt. Er wurde als Transfermethode für experimentelle Tiersysteme entwickelt. Anfangs stellte vor allem die Leber das primäre Zielorgan dar, aber auch der Gentransfer in den Muskel war inzwischen möglich [58, 59, 60]. Die hydrodynamische Schwanzveneninjektion in Nagetieren (Maus, Ratte) kann beinahe als Standardmethode bezeichnet werden und führt zu sehr guten Gentransferergebnissen [61]. Für den hydrodynamischen Gentransfer wird ein großes Volumen Vektorlösung in kurzer Zeit in große Gefäße injiziert. Durch diesen hydrodynamischen Druck werden die kleineren Gefäße derart gestreckt, dass sie durchlässig werden. Darüber hinaus werden in den Zellen in der Nähe der Blutgefäße Poren in der Zellmembran gebildet, durch die die Vektoren in die Zellen eindringen können. Für einen Gentransfer in die Leber von Mäusen werden z.B. 2 ml Vektorlösung (ca. 10% des Körpergewichts) innerhalb von weniger als 10 Sekunden injiziert [62]. Dabei kommt es zu einer Überstreckung der Herzmuskelfasern. Als Folge kann das Herz nicht mehr kontrahieren und es kommt zu einem retrograden Blutfluss in die Leber. So erreichen große Mengen der injizierten Lösung auf kurzem Weg die Leber. In Anlehnung an die Elektroporation wurde der Begriff der Hydroporation geprägt [49]. Bis heute wurden verschiedene Injektionsrouten, wie unter anderem Schwanzvene und Schwanzarterie, Portalvene und untere Hohlvene, unterschiedliche Zielorgane wie Leber, Niere, Muskel und Tumore in verschiedenen *in vivo* Modellen wie Fisch, Maus, Ratte, Schwein und Affe untersucht [61, 63, 64, 65, 66, 67].

Um den hydrodynamischen Gentransfer klinisch anzuwenden muss die nötige Flüssigkeitsmenge stark reduziert werden. Für die Schwanzveneninjektion im Mausmodell werden ca. 10% des Körpergewichts als Injektionsvolumen benötigt, welches innerhalb von wenigen Sekunden appliziert wird. Dabei wird das Blutvolumen verdoppelt. Für den Menschen würde dies ein Volumen von mehreren Litern bedeuten. Dies ist für eine klinische Anwendung nicht umsetzbar [68]. Weiterhin erscheint die Überstreckung der Herzmuskelfasern klinisch als äußerst risikoreich. Als Lösung bietet sich die direkte Perfusion des Zielorgans mit Hilfe von Kathetern an. In verschiedenen

Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass sich das benötigte Volumen auf unter zwei Prozent des Körpergewichts reduzieren lässt. Klinisch erscheint dies im Bereich des Möglichen zu liegen [61, 69, 70, 71]. Weiterhin wurde ein klinisch einsetzbares computergesteuertes Gerät für den hydrodynamischen Gentransfer entwickelt [72]. In einer ersten klinischen Studie konnte die Anwendbarkeit für die humane Gentherapie in der Leber gezeigt werden [61, 73].

1.2.2.2 Elektroporation

Die Elektroporation wurde bereits vor rund 30 Jahren etabliert. Diese Methode gehört damit zu den am längsten verwendeten Gentransfermethoden. Schon 1982 wurde *in vitro* gezeigt, dass ein Gentransfer nackter DNA mit Hilfe von hohen elektrischen Spannungen möglich ist [74]. In Tiermodellen konnte in den 90zigen gezeigt werden, dass auch die *in vivo* Anwendung möglich ist [75, 76, 77]. Klinisch wurde die Elektroporation ebenfalls zu dieser Zeit eingesetzt, allerdings zunächst nicht in Kombination mit einer Gentherapie, sondern als Elektrochemotherapie [78, 79].

Die Elektroporation führt zu transienten Poren in der Zellmembran. Auf diesem Weg können sonst nicht permeable Substanzen wie u.a. nicht-virale Vektoren in das Zellinnere gelangen. Dieser Vorgang wird auch als Elektropermeabilisierung bezeichnet [48]. Ziel ist es, eine Transmembranspannung aufzubauen, die die Porenbildung ermöglicht, gleichzeitig aber auch das Verschließen der gebildeten Poren erlaubt. Können die Poren nach dem Puls nicht mehr verschlossen werden, wird dies als irreversible Elektroporation bezeichnet und führt zum Zelltod. Die benötigte Spannung für eine erfolgreiche Elektroporation ist von zahlreichen Faktoren abhängig, dazu gehören Zelltyp, Zellgröße, Gewebe und umgebendes Medium, aber auch Pulslänge und Pulsform sind von entscheidender Bedeutung. Die Potentialdifferenz $\Delta\Psi_E(t)$ an einem Punkt M kann mit der folgenden Formel beschrieben werden:

$$\Delta\Psi_E(t) = \Psi_{\text{innen}} - \Psi_{\text{außen}} = -fg(\lambda)rE\cos\theta(M)[1 - e^{-t/\tau}]$$

Dabei hängt f von der Zellform, g von der Leitfähigkeit, r von der Zellgröße (Radius) ab, E stellt die Feldstärke, $\theta(M)$ die Orientierung im elektrischen Feld und τ die Ladezeit der Membran dar. Während der Elektroporation wird die Zelle gestreckt. Dabei wird die Membran hauptsächlich in Richtung des Pluspols „permeabilisiert“ (Abbildung 2), das heißt, es werden Poren gebildet [80, 81]. In Richtung des Minuspols werden weniger Poren gebildet, sodass dort auch weniger Vektoren aufgenommen werden [52, 82, 83, 84]. Nach der Elektroporation schließen sich die Poren aufgrund der Membranfluidität wieder.

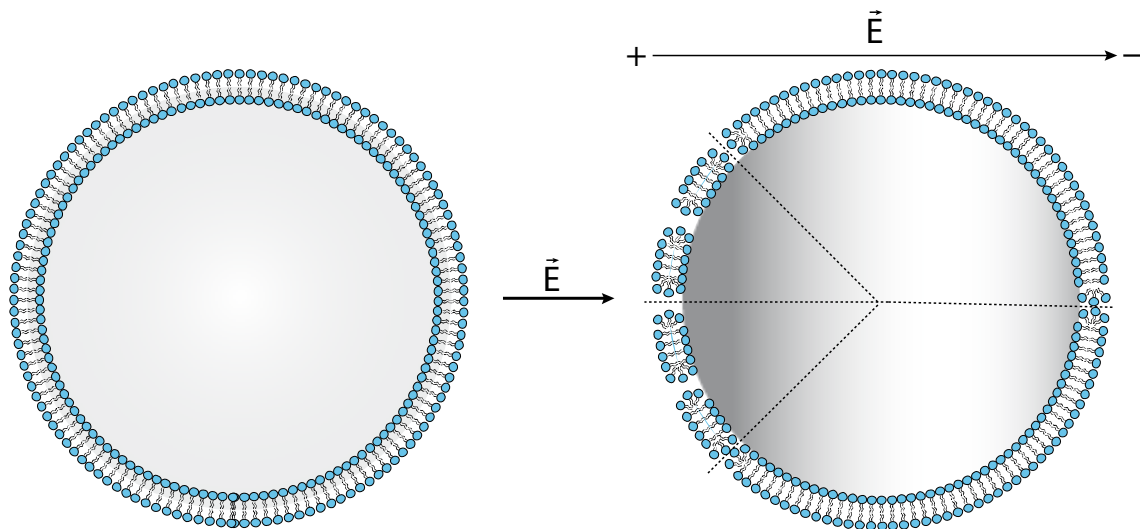


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Elektroporation

Die Zelle im Ruhezustand (links) nimmt keine Vektoren auf. Während der Elektroporation nimmt die Zelle aus dem Medium DNA, bzw. andere nicht permeable Substanzen, auf (rechts). Dies erfolgt hauptsächlich in Richtung des Pluspols (Graufärbung).

Als eigentlicher Aufnahmemechanismus für Nukleinsäuren nach Elektroporation werden verschiedene Vorgänge vermutet. Neben der Porenbildung können auch Elektrophorese, Ionenpumpenaggregation und Vesikelbildung nach Konzentrierung der DNA an der Membran eine Rolle spielen [52, 85]. Diese Mechanismen sind allerdings nicht vollständig aufgeklärt und werden auch kritisch diskutiert. Nach der Aufnahme der Vektoren müssen diese in den Zellkern transportiert werden. Dieser Vorgang erfolgt nicht passiv durch Diffusion in intakten Zellen, da die Beweglichkeit großer Moleküle (>2000 bp bzw. 1000 kDa) im Vergleich zu kleinen Molekülen im Zytoplasma stark eingeschränkt ist [53, 86]. Möglich erscheint der Transport entlang der Mikrotubuli (als nackte DNA oder in Vesikel verpackt), oder durch Diffusion unter der Annahme, dass das Zytoskelett durch die Spannung soweit geschädigt wurde, dass eine Diffusion möglich wird [52, 53]. Die letzte Barriere stellt die Kernmembran dar. Sie wird mit Hilfe der Kernporen in einem aktiven Prozess überwunden, da DNA-Vektoren aufgrund ihrer Größe (>250 bp) nicht frei in den Kern diffundieren können [54, 87].

1.2.2.3 Ballistischer Gentransfer

Nackte DNA kann auch mit Hilfe von Nanopartikeln in die Zelle eingebracht werden. Dafür werden meist Gold- oder Wolframpartikel mit Vektoren beladen und mit hoher Geschwindigkeit in die Zellen oder das Gewebe geschossen. Dies ist Grundlage für den bioballistischen Transfer, die Gene Gun, das „particle bombardment“ und die

Mikropartikelinjektion. Der ballistische Gentransfer wurde erstmals 1984 *in vitro* für die Transfektion von Pflanzenzellen eingesetzt [88]. Ziel war es, eine Gentransfermethode zu entwickeln, mit der Vektoren durch die Zellwand in die Pflanzenzelle transportiert werden können. Danach wurde diese Technologien auch für Säugerzellen und *in vivo* Modelle in verschiedenen Geweben (Maus, Ratte, Fisch, Schwein, Affe) eingesetzt [89, 90, 91, 92, 93]. Meist wird eine Immunisierung mit Hilfe eines Gentransfers in die Haut angestrebt. Der Grund dafür liegt in der geringen Eindringtiefe von wenigen Millimetern der Partikel, die den Gentransfer z.B. in dendritische Zellen ermöglicht. Dies ist für den Gentransfer in die Haut ausreichend und führt zu therapeutisch wirksamen Immunantworten [90]. Für die Tumorthherapie wurden ebenfalls Protokolle für den ballistischen Gentransfer entwickelt [94]. Klinisch wurde der ballistische Gentransfer *ex vivo* (Reperfusion der transfizierten Zellen) und *in vivo* erfolgreich eingesetzt. Auch hier war die Immunisierung das Ziel des Gentransfers [95, 96]. Da es hierbei keine Immunantwort gegen den Vektor selbst gibt, ist eine wiederholte Anwendung möglich. So können verschiedene Transgene, Reimmunisierungen und Boosts verabreicht werden [97]. Die Vektoren werden beim Durchschlagen des Gewebes und der Zellen von den Partikeln abgestreift und erreichen so das Zellinnere. Wird ein Zellkern direkt getroffen, so steht der Vektor für die Expression sofort zur Verfügung, andernfalls muss die DNA erst in den Zellkern transportiert werden. Bedingt durch die kleinen Partikel und die geringe Eindringtiefe kommt es nur zu äußerst geringen Gewebeschäden. Verschiedene Parameter, wie Zell- und Gewebeaufbau, aber auch Art der Partikelbeladung, Vektormenge, Partikelgeschwindigkeit und Partikelgröße haben Einfluss auf den ballistischen Gentransfer [98].

Die Helios Gene Gun (Bio-Rad, Hercules, CA) ist das zurzeit einzige kommerziell erhältliche Gerät für den ballistischen Gentransfer. Sie besitzt allerdings bisher keine Zulassung für den klinischen Einsatz. Mit Hilfe einer Helium-Gas Schockwelle werden die mit den Vektoren beladenen Partikel beschleunigt, sodass sie das Gewebe und die Zielzellen durchdringen können. Dies führt zum Gentransfer. Mit Hilfe dieser Technik können verschiedene Substanzen transferiert werden, sobald sie auf Goldpartikel geladen wurden.

1.2.2.4 Gentransfer mit Hilfe von Ultraschall

Ultraschall wird vor allem für die nicht-invasive Bildgebung in der Medizin eingesetzt. Mit Hilfe moderner Geräte sind dabei inzwischen 4D Aufnahmen (3D Bildgebung in Echtzeit) möglich. Dies wird mit Hilfe von vergleichsweise geringen Schallintensitäten

erreicht. Daneben kann fokussierter Ultraschall zur direkten hyperthermen Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt werden [99]. Das Gewebe wird dabei lokal stark erhitzt und dadurch zerstört. Selbst bei sehr großen Energieeinträgen in das Gewebe ist die Methode klinisch anwendbar und sicher. Auch für andere klinische Anwendungen kann Ultraschall eingesetzt werden.

Mitte der 90ziger Jahre konnte gezeigt werden, dass Ultraschall, auch als Sonoporation bezeichnet, für den nicht-viralen Gentransfer anwendbar ist [100]. Wenig später wurde auch *in vivo* gezeigt, dass mit Hilfe von Ultraschall ein Gentransfer möglich ist [101]. Dabei spielen verschiedene Parameter wie Intensität, Frequenz und Pulswiederholung des Ultraschalls aber auch die Gewebeart eine wichtige Rolle [102]. Um die Gentransfereffizienz zu erhöhen, wird an Kombinationsverfahren, z.B. Elektro-Sonoporation, gearbeitet [103, 104]. Auch kann die Sonoporation für den Transfer komplexierter DNA (Liposomen) eingesetzt werden [105]. Neben DNA können mit Hilfe des Ultraschalls auch andere Moleküle wie z.B. Chemotherapeutika in die Zellen eingebracht werden [106]. Der genaue Mechanismus der Sonoporation ist nicht bekannt. Man geht davon aus, dass die erhöhte DNA-Aufnahme der Zellen durch Membranperforation und Kavitation (Bildung von Mikroblasen) verursacht wird [107]. So wird die Permeabilität von sonst nicht-permeablen Molekülen durch die Zellmembran erhöht. Limitierend für den Gentransfer sind Apoptose und Nekrose nach zu ausgedehnter Membranschädigung durch zu starke Sonoporationsbedingungen [102, 108]. Bei Ultraschallintensitäten, die das Gewebe nicht schädigen, bleibt auch die Vektor-DNA intakt [109]. Die Entwicklung des Ultraschalls als Gentransfermethode wurde bisher auch in Großtiermodellen (Schwein) vorangetrieben [110]. Es konnten verschiedene Organe und Gewebe mit unterschiedlichen Transgenen erfolgreich behandelt werden, sodass eine klinische Anwendung möglich erscheint. Dafür werden optimierte Kontrastmittel eingesetzt, die eine erhöhte Spezifität mit sich bringen können (Targeting) [111]. Mit Hilfe dieser neuartigen Kontrastmittel kann die Konzentration der Mikroblasen am gewünschten Ort auf das benötigte Niveau erhöht werden, ohne die systemische Belastung des Patienten zu erhöhen.

1.2.2.5 Gentransfer mit Hilfe magnetischer Kräfte

Einer der limitierenden Faktoren für einen erfolgreichen Einsatz der Gentherapie ist die Verfügbarkeit der Vektoren im Zielgewebe [112]. Erfolgt die Applikation systemisch, so werden die verwendeten Vektoren im gesamten Organismus verteilt, aber auch bei lokaler Applikation, z.B. intratumoral, werden sie über die Blut- oder Lymphbahn aus

dem Gewebe „ausgewaschen“ und stark verdünnt. So stehen sie kaum noch für einen Gentransfer zur Verfügung. Neben dem systemischen Verlust werden vor allem nicht-virale Vektoren *in vivo* schnell durch im Gewebe vorkommende Nukleasen teilweise oder vollständig degradiert [113]. Eine hohe Konzentration intakter Vektoren im Zielgewebe ist aber häufig nötig und erwünscht. Des Weiteren können systemisch verteilte Vektoren zu unerwünschten Nebeneffekten führen, da auch Zellen außerhalb des Zielgewebes mit den Vektoren in Kontakt kommen. Mit Hilfe magnetischer Kräfte kann die Gentransfereffizienz erhöht werden, da die verwendeten Gentransfervehikel an magnetische Nanopartikel gekoppelt werden. Durch ein magnetisches Feld können die Nanopartikel im Zielgewebe gefangen und konzentriert werden [109]. Die Nanopartikel bestehen aus magnetischen Verbindungen, vor allem finden Metalle der ersten Nebengruppe Verwendung. Hauptsächlich werden Eisenoxide verwendet. Es können neben DNA und RNA auch ganze Viruspartikel oder kleinere Moleküle wie Chemotherapeutika an diese Nanopartikel gekoppelt werden [114, 115]. Dies kann mit Hilfe von Antikörpern, Streptavidin/Biotin oder mit Hilfe Salz-induzierter Aggregation geschehen [116]. Die so hergestellten Aggregate führen auch im magnetischen Feld nicht zu einem Gentransfer [117]. Erst wenn zusätzliche Substanzen zum Einsatz kommen, die den Transfer des Vektors in die Zelle ermöglichen, kommt es zu einem Gentransfer. Werden dafür Moleküle wie Polyethylenimin (PEI) o. Ä. verwendet, spricht man von Magnetofektion. Die Nanopartikel sind also selbst nicht der Vektor, sie dienen nur der Vektorakkumulation am Zielort. Durch die hohe Vektorkonzentration wird eine große Zellzahl sehr schnell transfiziert, da sie innerhalb kurzer Zeit mit einer großen Zahl von Vektoren in Kontakt kommen. Dies gilt für nicht-virale Vektoren genauso, wie für Viren und kleinere Moleküle. Die Magnetofektion wurde bisher *in vitro* für eine Vielzahl von Zellarten eingesetzt. Auch *in vivo* konnte sie erfolgreich in verschiedenen Modellen (Maus, Ratte) benutzt werden [117, 118]. Der Einsatz magnetischer Kräfte in der Klinik ist seit langem bekannt. Man benutzt sie vor allem für die Bildgebung (MRI), sodass die pharmakokinetischen Eigenschaften verschiedener magnetischer Partikel wie auch die Anwendung magnetischer Felder für Patienten bekannt sind [119]. Darüber hinaus wurden vor allem Zytostatika mit Hilfe magnetischer Partikel in Tumoren von Patienten transportiert [115, 120].

1.2.2.6 Gentransfer mit Hilfe von Aerosolen

Aerosole werden seit vielen Jahren für die Behandlung von Erkrankungen der Atemwege eingesetzt [121]. Dazu gehören Asthma, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD) und Cystische Fibrose (CF). Aber auch anti-virale, antibakterielle und fungizide Behandlungen sowie Applikation von Hormonen oder Vakzinen sind verfügbar bzw. in der Entwicklung [122]. Auch der Einsatz in der Krebstherapie erscheint möglich [123]. Für die Applikation stehen verschiedene Geräteformen, wie Jet-Nebulizer oder Puderinhalationsgeräte zur Verfügung [122]. Für die Gentherapie wurden Aerosole erstmals in den 90igern für den Gentransfer in die Lungen von Tiermodellen (Maus, Kaninchen) verwendet [124, 125]. Zu den Vorteilen des Gentransfers mit Aerosolen gehören die große Absorption der Vektoren aufgrund der großen Oberfläche der Lunge, die verringerte systemische Zytotoxizität, die schnelle Bioverfügbarkeit und das die Methode nicht-invasiv ist [123]. Die Effektivität der Aerosolverteilung in der Lunge hängt von verschiedenen Parametern wie Atmung, Morphologie der Atemwege und Aerosol- und Applikationsart ab [126, 127]. Dabei ist das Aerosol kein Vektor an sich, sondern es werden als Vehikel in der Regel synthetische Vektoren wie DOTMA, PEI und andere verwendet [128]. Aber auch virale Vektoren wie Adenoviren und AAV wurden verwendet [129, 130]. Die Verbreitung dieser Viren mit Hilfe von Aerosolen stellt schließlich den natürlichen Infektionsweg dar. Sowohl die gentherapeutische Anwendung von Aerosolen in Kombination mit synthetischen als auch viralen Vektoren wurde bereits klinisch erfolgreich durchgeführt [131, 132, 133].

1.2.2.7 Jet-Injektion

Die Nadelinjektion von nackter DNA in den Muskel stellt eine sehr einfache Form des Gentransfers dar. Sie führt zu einer lokal begrenzten Expression der verwendeten DNA. Häufig werden aber nur sehr geringe Transfereffizienzen gefunden, vor allem in Geweben außerhalb der Skelettmuskulatur [134, 135]. Speziell für die Tumorgentherapie ist die Nadelinjektion wenig geeignet, vor allem bedingt durch den hohen hydrostatischen Druck des Tumorgewebes. Dies vermindert das Verbleiben der Injektionslösung im Gewebe [136, 137]. Eine alternative Entwicklung dieser Form des Gentransfers ist die nadellose Jet-Injektion. Mit Hilfe dieser Technologie werden sehr kleine Volumina von nackter oder auch komplexierter Nukleinsäure in das Gewebe eingebracht [138]. Das Verwenden nackter DNA hat den Vorteil einer sehr genauen Dosierung, kostengünstiger Herstellung und einer hohen Stabilität. Die Verwendung

von chemischen Vektoren macht eine aufwendige Kontrolle der Komplexe nötig und erhöht den Aufwand für Lagerung und Transport. Des Weiteren ist die Penetration von Partikeln in das Gewebe sehr begrenzt [139, 140]. Die Vektoren werden durch die nadellose Jet-Injektion direkt in das Zielgewebe injiziert. Die Verwendung sehr kleiner Volumina und damit kleiner Mengen an Vektor-DNA hält die Belastung für den Organismus und das Risiko gering. Die Anwendung der Jet-Injektion ist dabei nicht nur auf Muskelgewebe begrenzt, sondern kann für jede Art von Gewebe eingesetzt werden. Durch Anpassung der Parameter für die Jet-Injektion ist ein intradermaler Gentransfer [141] ebenso möglich, wie eine Anwendung für andere Gewebe, sobald sie für die Jet-Injektion erreichbar sind. Eine Verbindung von endoskopischen Techniken mit der Jet-Injektion für einen Gentransfer in innere Organe (z.B. Leber, Niere, von außen nicht zugängliches Tumorgewebe etc.) erscheint möglich.

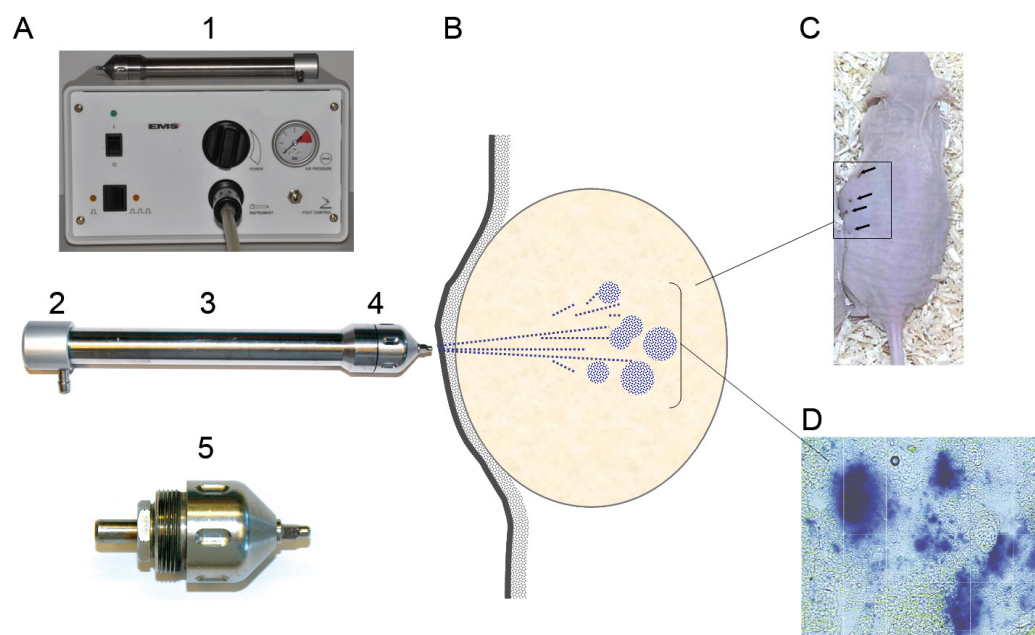


Abbildung 3: Prinzip der Jet-Injektion

A) Jet-Injektor (Swiss-Injektor)

B) Schematische Darstellung der intratumoralen Jet-Injektion durch die Haut.

C) Die *in vivo* Applikation in subkutane Tumore zeigt kleine Perforationen sowie zeitlich begrenzte Mikrobloodungen in der Haut.

D) Die Expressionsareale nach intratumoralem β-Galactosidase (LacZ) Gentransfer sind *in vivo* lokal begrenzt und von unterschiedlicher Intensität. Die transfizierten Zellen sind durch die Enzymaktivität des verwendeten Reportergens LacZ blau gefärbt.

Die Jet-Injektion mittels des in der Arbeit verwendeten Swiss-Injektors (EMS Medical, Nyon, Schweiz) basiert auf der Nutzung von fokussierten Hochdruck-Flüssigkeitsstrahlen, den sogenannten Jets. Sie durchdringen die Haut mit hoher

Geschwindigkeit (>300 m/s) und können bis zu mehrere Zentimeter in das Gewebe eindringen [142]. Durch den Widerstand des Gewebes fächert der Strahl auf und sorgt so für eine Verteilung im Gewebe. Dies führt zu einem Gentransfer.

Man benötigt für die Jet-Injektion eine Kontrolleinheit, die den Druck regelt und einen Applikator, der den Flüssigkeitsstrahl (Jet) generiert (Abbildung 3 A 1). Im Applikator wird durch Gas ein Kolben angetrieben, wodurch mit Hilfe einer Düse im Kopfstück der Jet entsteht. (Abbildung 3 A 2-4). Die Vektorlösung befindet sich in einem Reservoir im Kopfstück (Abbildung 3 A 5). Die Applikation des Jets wird in Abbildung 3 B schematisch dargestellt. Sie erfolgt durch die Haut in das darunterliegende Gewebe (z.B. Tumor). In einem Mausmodell zeigen Abbildung 3 C und D, dass es durch die Jets nicht zu ausgedehnten Gewebeschäden kommt, aber ein lokaler Gentransfer erreicht wird. Kleine Blutungen können einfach gestillt werden und heilen innerhalb kurzer Zeit ab. Die transfizierten Areale sind lokal begrenzt und es findet kein Gentransfer in entfernten Geweben statt. Durch den verwendeten Druck während der Applikation der Vektorlösung kommt es zu Gewebeschäden, die allerdings nicht zu einer erhöhten Metastasenbildung durch freigesetzte Tumorzellen führen [143].

Neben dem vorgestellten Swiss-Injector sind weitere Jet-Injektoren verfügbar, wie z.B. Ped-O-Jet und Bioject [144]. Im Gegensatz zu anderen Geräten, die bis zu $100\text{ }\mu\text{l}$ und mehr Flüssigkeit applizieren, werden mit dem Swiss-Injector sehr kleine Volumina ($<10\text{ }\mu\text{l}$) in das Gewebe eingebracht. Dies erlaubt eine zusätzliche Verteilung der Injektionen. Der Swiss-Injector wird typischerweise mit 2,6-3,0 bar Druck betrieben. Dieser Druck beschleunigt die Vektorlösung auf bis zu 300 m/s . Ein erhöhter Druck führt dabei zu einer erhöhten Eindringtiefe, einem größeren Transfervolumen und zu einer stärkeren Auffächerung des Flüssigkeitsstrahls. Auf der anderen Seite erhöht ein größerer Druck auch die Gewebeschäden. Es können Vektorlösungen in weiten Konzentrationsbereichen eingesetzt werden. Die Konzentration von 1 mg DNA pro ml hat sich als optimal erwiesen. Hier ist die Viskosität der Lösung gering und die Herstellung des Vektors unproblematisch [145]. Einige nadelfreie Injektionssysteme mit klinischem Potential, wie z.B. Ped-O-Jet und Bioject, konnten in Tiermodellen erfolgreich eingesetzt werden [146]. Der Swiss-Injector ist jedoch derzeit das einzige Gerät, das für einen erfolgreichen Gentransfer in einer klinischen Studie angewendet wurde [113].

1.3 Nicht-virale Vektorsysteme

Neben den vorgestellten nicht-viralen Gentransfermethoden wurde viel Arbeit in die Entwicklung neuer Vektoren investiert. Vorrangiges Ziel ist es, deren Gentransfereffizienz zu verbessern. Dazu zählen die Aufnahme der Vektoren in die Zelle und der Transport in den Zellkern. Daneben sollen aber auch die Sicherheit und das Targeting der Gentherapie erhöht werden. Zu den Sicherheitsbedenken zählen die Expression von Genen aus dem Vektorrückgrat, die Induktion einer ungewollten Immunantwort gegen das Genprodukt, die Veränderung der zellulären Expressionsmuster durch exprimierte Resistenzgene, die Nutzung kryptischer Expressionssignale oder die Induktion von Immunantworten durch CpG-Inseln [147, 148, 149]. Aber auch die Dauer der Genexpression muss für einige Anwendungen signifikant verlängert werden. So sind episomal replizierte Plasmide nicht ohne weiteres für den Einsatz in der Therapie von Stoffwechselerkrankungen geeignet, da die Genexpression nur wenige Tage oder Wochen anhält.

1.3.1 Minicircle

Konventionelle Plasmide enthalten zahlreiche genetische Elemente, die zwar für die Produktion nötig, aber für die gentherapeutische Anwendung durchaus verzichtbar sind. Dazu gehören Elemente wie pro- und eukaryotische Selektionsmarker, Promotoren und Enhancer außerhalb der gewünschten Expressionskassette und Replikationsurspünge (origin of replication, ORI) aber auch CpG-Inseln (5'-CG-3' Dinukleotide) des Vektorrückgrats [150]. Ein eleganter Weg, diese Elemente des Plasmidrückgrats nach der Synthese zu entfernen, ist die intramolekulare Rekombination im produzierenden Bakterium „*in vivo*“ oder nach der Synthese *in vitro*. Die dabei entstehenden Konstrukte mit der Expressionskassette werden Minicircle genannt (Abbildung 4). Diese Bezeichnung wird auch für die mitochondriale DNA von Trypanosomen verwendet. Die Minicircles als Vektoren wurden Mitte der 90ziger Jahre erstmals beschrieben [151, 152]. Um Minicircles zu generieren, werden in den Ausgangsplasmiden Erkennungsstellen für Rekombinasen möglichst nah an der Expressionskassette eingefügt (Abbildung 4). Wird die Rekombinase im produzierenden Bakterium exprimiert, so entstehen aus dem Ausgangsplasmid zwei kleinere Konstrukte. Auf der einen Seite ein replikatives Miniplasmid, auf der anderen Seite der gewünschte Minicircle. Das Miniplasmid besteht aus dem größten Anteil des Plasmidrückgrats des Ausgangsplasmids. Technisch bedingt bleibt dabei ein kleiner Teil der Rekombinase-Erkennungsstelle im Minicircle erhalten (Abbildung 4). Das

Miniplasmid wird im weiteren Verlauf entfernt, da das ehemalige Plasmidrückgrat für den Minicircle keine Bedeutung mehr hat und für die Anwendung des Minicircle als Vektor unnötig ist. Als Rekombinationssysteme werden die λ -Integrase Familie (Integrasen und Rekombinasen von Bakteriophagen und Hefen) und die Serin-Rekombinase Familie (Integrasen von Bakteriophagen) verwendet [153]. Sie unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, monomere Minicircle-Moleküle zu produzieren [154]. Dabei haben sich Systeme aus der Serin-Rekombinase Familie als sehr geeignet erwiesen, da sie vor allem monomere Minicircle produzieren [155, 156].

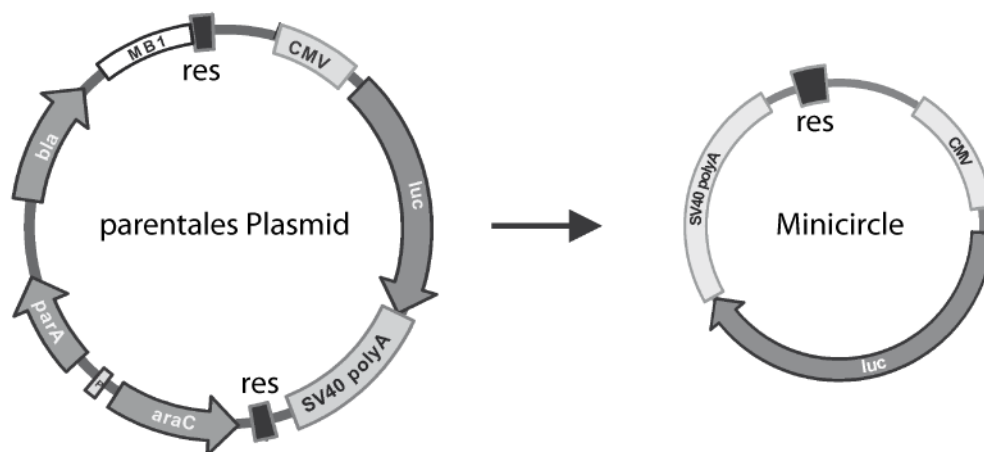


Abbildung 4: Der Minicircle-Vektor schematisch [153]

Die Abbildung zeigt den Minicircle im Vergleich zum parentalen Plasmid. Während der Produktion wird das Plasmidrückgrat inklusive der für die Produktion notwendigen Elemente (z. B. bla- Resistenzgen (β -Laktamase); parA- Segregationsfaktor, erhöht genetische Stabilität; araC- induzierbare Transkriptionsregulation, MB1- Replikationsursprung) von den Sequenzen des Minicircle mit der Expressionkassette durch eine Rekombinase entfernt. Sind die Erkennungsstellen für die Rekombinase (res) optimal platziert, enthält der Minicircle neben den für die Expression nötigen Sequenzen kaum weitere genetische Elemente.

Nachdem die extrachromosomale DNA aufgereinigt wurde, kann das Minicircle-Konstrukt isoliert werden. Dies kann mit Hilfe von chromatographischen Methoden, Dichtegradienten-Zentrifugation (Cäsiumchlorid), Affinitätsreinigungen oder mit Standardmethoden (Reinigung über Silicamembranen oder Gelelektion) geschehen. Meist werden Reste des Ausgangsplasmids und das Miniplasmid mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut. Dieser Verdau kann bereits im Bakterium erfolgen, wenn die Restriktionsendonukleasen induzierbar exprimiert werden können. Minicircle-Vektoren wurden bereits *in vitro* in vielen Zelllinien (Hela, NIH 3T3, HEK 293) vergleichend verwendet, aber auch in *in vivo* Modellen untersucht (Maus) [154, 157,

158]. In allen Modellen erwiesen sich die optimierten Minicircle-Vektoren den parentalen Plasmiden als überlegen.

Aufgrund ihrer geschlossen zirkulären Struktur können die Minicircle-Vektoren im Gegensatz zu den MIDGE-basierten Vektoren in der Zelle repliziert werden. Dafür sind allerdings weitere genetische Elemente wie virale ORIs oder scaffold/matrix attachment regions (S/MAR) nötig, die den Vektor wiederum vergrößern. Die viralen ORIs sind allerdings von viralen Proteinen abhängig, die zur Zelltransformation führen können [159]. Werden die Vektoren auf diesem Weg mehrfach pro Zellzyklus repliziert, so kann dies zum Zelltod führen [159]. S/MARs stellen genetische Elemente dar, an denen die Strangteilung während des Zellzyklus sehr gut möglich ist. So werden Vektoren mit S/MAR einmal pro Zellzyklus repliziert [160]. Diese Eigenschaft macht speziell große S/MARs physikalisch instabil. Dies kann zu einer erhöhten Integrationsrate wenigstens in *in vitro* Modellen führen. Dieses Risiko kann durch die Verwendung kleinerer S/MARs verringert werden [159]. Der Vorteil besteht jedoch in der Verlängerung der Transgenexpression.

1.3.2 MIDGE

Die MIDGE-Vektoren (**M**inimalistische **I**mmunologisch **D**efinierte **G**en**E**xpression) wurden in den 90ziger Jahren entwickelt und werden seit 1998 von der Firma Mologen AG vertrieben und weiterentwickelt. Sie stellen die kleinsten verfügbaren Vektoren für den Gentransfer von proteinkodierenden Expressionskassetten dar. MIDGE-Vektoren sind kleine, doppelsträngige, lineare DNA-Moleküle mit kovalent verschlossenen Enden. Im Gegensatz zu den Minicircle-Vektoren sind keine Sequenzabschnitte außer den für die Expression notwendigen Elementen mehr vorhanden. MIDGEs wurden bisher hauptsächlich für Vakzinierungsstudien verwendet. Die Firma Mologen AG selbst entwickelt auf Basis ihrer Technologien MIDGE und dSLIM (**d**ouble **S**tem **L**oop **I**mmuno**M**odulator, TLR9-Agonist) Medikamente für den Einsatz in der Tumorthherapie (Darm-, Prostata-, Nierenkrebs), aber auch für die Vakzinierung gegen Infektionskrankheiten wie Leishmaniose und Hepatitis B.

Die Produktion der MIDGE-Vektoren ist vergleichsweise einfach. Die Expressionskassette kann mit Hilfe der PCR amplifiziert werden, oder sie kann durch Restriktionsorte aus den Plasmiden ausgeschnitten werden. In beiden Fällen werden durch die entsprechend eingefügten Restriktionsorte vor und nach dem benötigten Bereich Überhänge durch einen Restriktionsverdau generiert. An diese Überhänge können kleine Hairpins angehängt werden. Es sind dann keine offenen 5'- und 3'-

Enden vorhanden. Dies erhöht die Resistenz der Vektoren gegenüber Exonukleasen. Die so hergestellten MIDGE-Vektoren enthalten neben den Elementen für die Genexpression (Promotor, Intron, Transgen, pA-Signal etc.) nur kleinste Restsequenzen vor und nach der Expressionskassette (Abbildung 5).

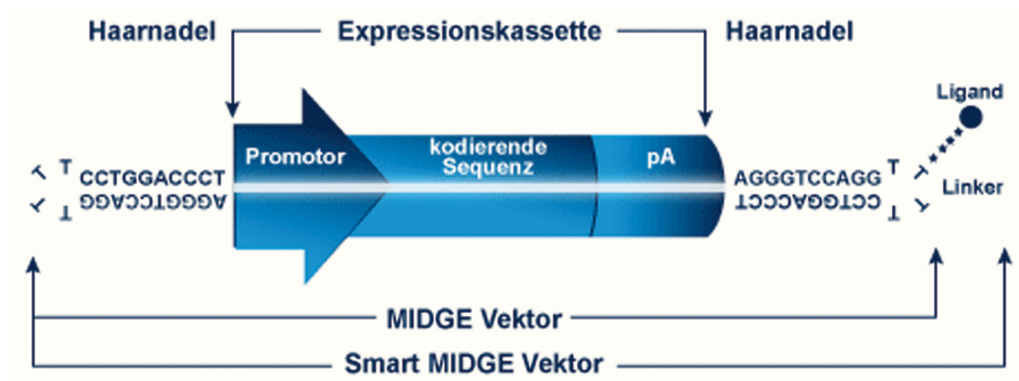


Abbildung 5: Der MIDGE-Vektor schematisch

Der MIDGE-Vektor besteht nur aus der Expressionskassette und kleinen Thymidin-haltigen Hairpins an den Enden, die weiter modifiziert werden können.

Mit Hilfe der Hairpins können leicht Modifizierungen in den Vektor eingefügt werden. So können seine Eigenschaften dem jeweiligen Einsatzzweck angepasst werden. Es ist u.a. möglich, Peptide oder Kohlenhydrate an den Vektor zu koppeln (Abbildung 5). So können Liganden für Oberflächenrezeptoren des gewünschten Zelltyps genutzt werden, um ein Zell- oder Gewebetargeting zu erreichen. Eine besondere Klasse der MIDGE-Vektoren stellen die MIDGE-TH1-Moleküle dar. Sie sind mit einem Signalmolekül ausgestattet, welches eine TH1-Antwort fördert. Sie sind im besonderen Maße für Einsatz im Bereich der DNA-Vakzinierung geeignet. Die MIDGE-Vektoren wurden bisher in verschiedenen Tumorzelltypen (z.B. Kolon, Melanom, Leukämie), Tiermodellen (Maus, Ratte, Katze, Hund, Rind, Pferd) sowie klinisch (ex vivo Gentransfer) erfolgreich eingesetzt [161, 162, 163, 164, 165, 166].

Aufgrund ihrer Struktur und vor allem ihrer verringerten Größe und damit einhergehend einem verringerten Gehalt von nicht-essentiellen Elementen, bieten die optimierten Vektoren Minicircle und MIDGE ein hohes klinisches Potential, dass im Rahmen dieser Arbeit detailliert untersucht wurde.

1.3.3 Transposon/ Transposase-basierte Vektoren

Zu den größten Einschränkungen des nicht-viralen Gentransfers gehört die transiente Natur der Genexpression. Je nach verwendetem Vektor und Transferstrategie endet die Genexpression teilweise bereits wenige Tage nach dem Gentransfer. Neben der episomalen Replikation der nicht-viralen Vektoren mit Hilfe von Replikationsursprüngen (ORIs) oder S/MARs kann die Transgenexpression durch Integration der Expressionskassette in das Genom verlängert werden. Dafür stehen Transposon/Transposase-basierte Systeme zur Verfügung. Sie bieten im Vergleich zu integrativen viralen Systemen eine hohe Kapazität und genetische Stabilität. Das einfachste Transposon besteht aus den Erkennungsstellen für die Transposase, meist „inverted repeats“ (IR), die die Expressionskassette flankieren. Das Transposon würde selbst für die Transposase kodieren, die die Expressionskassette mobilisiert. Wird die Transposase in trans kodiert, d.h. auf einem anderen Vektor, so kann innerhalb des Transposons ein neues Transgen anstatt der Transposase kodiert werden. Es wird dann genauso wie vorher die Transposase in das Genom integriert. Da der sekundäre Vektor mit der kodierten Transposase nur transient vorhanden ist, wird das Enzym innerhalb kurzer Zeit wieder verschwinden, sodass das integrierte Transposon stabil im Genom verbleibt, da nun kein mobilisierendes Enzym zur Verfügung steht. Heute sind verschiedene Transposon/ Transposase Kombinationen bekannt, die in Säugerzellen aktiv sind. Dazu gehören Transposasen wie Sleeping Beauty, Frog Prince, mariner, Minos, Tol2 und piggyBac [167, 168, 169, 170, 171]. Die Integration erfolgt vor allem mit Hilfe von Sleeping Beauty Transposasen weitgehend beliebig (random) im Genom [172]. Dadurch wird das Risiko einer insertionellen Mutagenese, wie sie bei Retroviren beobachtet werden kann, gesenkt. Die retrovirale Integration erfolgt bevorzugt in transkriptionell aktiven Bereichen, was u.a. zu einer Onkogenaktivierung führen kann [173, 174]. Um die Gefahr einer insertionellen Mutagenese weiter zu verringern, werden sowohl die Transposons wie auch die Transposasen modifiziert, um die Integration außerhalb transkriptionell aktiver Bereiche zu fördern [175]. Ein weiteres Risiko für den klinischen Einsatz von Transposons in der Gentherapie stellt die Mobilisierung von Transposon-ähnlichen Sequenzen im humanen Genom durch die verwendete Transposase dar. So können Sequenzen im Humangenom gefunden werden, die den Erkennungsstellen für piggyBac sehr ähnlich sind [176]. Die Sleeping Beauty Transposase wurde bereits intensiv *in vitro* als auch *in vivo* untersucht, sodass eine erste klinische Studie in den USA vom NIH genehmigt wurde [177]. In dieser

Studie werden T-Zellen *ex vivo* mit einem chimären Antigenrezeptor ausgestattet und in die Patienten nach Chemotherapie infundiert [177].

1.4 Der humane Tumornekrosefaktor-alpha

Der humane Tumornekrosefaktor-alpha ($\text{hTNF}\alpha$) ist ein pleiotropes Zytokin. Seine Wirkung auf Tumore wurde bereits im 19. Jahrhundert entdeckt, ohne das etwas über die molekularen Grundlagen bekannt war (Coley's Toxin) [178]. Später konnte gezeigt werden, dass die Wirkung nicht direkt auf das Toxin zurückzuführen war, sondern dass ein Wirtsfaktor zur Tumoregression führte. Das Serum bakterieninfizierter Mäuse konnte eine hämorrhagische Nekrose bestimmter Tumore auslösen [179]. Dieser Faktor wurde deshalb Tumornekrosefaktor genannt. Heute kennt man $\text{hTNF}\alpha$ als Mitglied der TNF/TNFR-Superfamilie [180]. Diese Familie beinhaltet mindestens 40 Mitglieder [180]. Der humane Tumornekrosefaktor-alpha wurde 1985 isoliert [181]. Die Eigenschaft, Tumore in die Nekrose zu treiben, weckte die Hoffnung, man könnte ihn für die Tumorthherapie einsetzen. Die starke Toxizität bei hochdosierter systemischer Anwendung begrenzte allerdings diese Möglichkeit [180, 182].

$\text{TNF}\alpha$ und die weiteren Mitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie werden hauptsächlich von Immunzellen, wie aktivierten Makrophagen, Lymphozyten, NK-Zellen und Mastzellen, aber auch von Stromazellen exprimiert. Sie bilden $\text{TNF}\alpha$ als Transmembran-Protein, welches durch ein $\text{TNF}\alpha$ -konvertierendes Enzym (TACE) geschnitten und damit freigesetzt wird. Als lösliches $\text{TNF}\alpha$ bildet es Homotrimere und entfaltet seine Wirkung auf TNF-Rezeptor (TNFR)-positive Zellen wie Makrophagen, Knochen- und Knorpelzellen, Endothelzellen oder Synovialzellen [183]. Da die TNF-Rezeptoren auf fast allen Zellen vorhanden sind, führen große systemische Mengen $\text{TNF}\alpha$ u.a. zum Schock oder Herz-Kreislauf-Kollaps [182]. Allgemein kann $\text{TNF}\alpha$ zu Fieber und ausgedehnten Entzündungsreaktionen führen.

Es sind zwei Rezeptoren für $\text{TNF}\alpha$, TNFR-1 und TNFR-2, bekannt. Der TNFR-1 bindet vor allem das freie $\text{TNF}\alpha$. Da er eine sogenannte Todesdomäne besitzt, kann durch die Signalübermittlung dieses Rezeptors u.a. die Apoptose ausgelöst werden. TNFR-2 besitzt keine Todesdomäne und bindet vor allem die membrangebundene Form von $\text{TNF}\alpha$. Er kann die Wirkung des TNFR-1 verstärken, führt aber auch zur T-Zell-Proliferation und Insulinresistenz [183]. Zu den Wirkungen auf molekularer Ebene von $\text{TNF}\alpha$ gehören die Aktivierung von NF- κ B- und MAP-Kinase Signalwegen, die Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges, sowie die Expression von

Adhäsionsmolekülen und Chemokinen [182, 184].

Trotz seiner antitumoralen Aktivität konnte hTNF α die Hoffnung, eine wirksame Substanz für die Krebstherapie zu besitzen, nicht erfüllen. Die Patienten zeigten dosislimitierende Reaktionen auf die systemische Behandlung mit rekombinantem hTNF α [185, 186]. Darüber hinaus zeigten die in diesen Studien verwendeten Dosen nur eine geringe antitumorale Aktivität. Die höchste von Patienten tolerierte Dosis für die systemische Applikation von hTNF α lag ca. 10-fach unter der effektiven Dosis im Tiermodell [186]. Dies führte zum Konzept der lokalen Anwendung von hTNF α in der Tumorthherapie. Mit Hilfe der isolierten Extremitätenperfusion von hTNF α in Kombination mit z.B. Melphalan und Hyperthermie können hohe Ansprechraten von Sarkomen und Melanomen erreicht werden [178, 187, 188, 189]. Diese Behandlung ist in Europa für die Tumorthherapie zugelassen und wird auch in den USA durchgeführt. Es hat sich allerdings gezeigt, dass hTNF α aufgrund seiner pleiotropen Eigenschaften auch progressiv auf das Tumorwachstum wirken kann. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass hTNF α für die Tumorentstehung und frühe Progression notwendig sein kann [190]. Dies ist u.a. auf die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges zurückzuführen. Durch ihn werden Gene, die mit Invasion und Metastasierung in Verbindung stehen, exprimiert, wie z.B. Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren oder Matrix-Metalloproteasen. Trotzdem hat hTNF α auch klinisch therapeutische Erfolge vor allem in Kombinationstherapien gezeigt. Dabei wird zusätzlich ausgenutzt, dass die Wirkung von hTNF α auch zu einer erhöhten Gefäß-Permeabilität für Zytostatika, wie z.B. Melphalan und Doxorubizin, führt [178].

Der Tumornekrosefaktor-alpha ist auch heute ein interessanter Kandidat für die kombinierte Tumorthherapie. Allerdings müssen die Tumorentität und die Form der Behandlung sorgfältig ausgewählt werden, um einen Vorteil für den Patienten zu erreichen. Um die Menge an hTNF α möglichst niedrig zu halten, stellt die Gentherapie eine Option für die lokale Produktion von hTNF α dar. So kann intratumoral eine hTNF α -Konzentration erreicht werden, die für die Chemosensitivierung ausreicht, aber die systemische Belastung für den Patienten niedrig bleibt. Es werden virale wie nicht-virale Konzepte für den lokalen Gentransfer von hTNF α experimentell und klinisch untersucht. So ist es Ziel dieser Arbeit, die das Konzept für eine kombinierte Therapie des malignen Melanoms aus lokalem nicht-viralem hTNF α -Gentransfer mit der Jet-Injektion und Vindesinbehandlung zu prüfen.

1.5 Der Zelltod durch Apoptose und Nekrose

Die Apoptose oder Nekrose stellen im Zusammenhang mit einer $\text{TNF}\alpha$ -Applikation mögliche Mechanismen des Zelltodes dar. Das Konzept der Apoptose wurde auf der Grundlage von früheren Arbeiten als Gegenspieler der Mitose 1972 eingeführt [191]. Man erkannte, dass der Verlust von Zellen („Nekrobiose oder physiologischer Zelltod“) zum Wachstum eines Organismus gehört, um die Zellpopulation zu kontrollieren. Die Autoren konnten bereits in dieser Arbeit die wesentlichen Eigenschaften der Apoptose beschreiben: zunächst Kondensation des Zellinhalts und darauf folgend die Fragmentierung der Zelle mit Bildung von sogenannten „apoptotic bodies“. Im Rahmen der Arbeit mit *C. elegans* wurde die Apoptose auch programmierter Zelltod genannt. Dieser Wurm bildet während seiner Entwicklung 1090 somatische Zellen. Davon sterben unter normalen Bedingungen exakt 131 Zellen durch Apoptose, was auf die genaue Steuerung von Zellproliferation und Zelltod hinweist.

Die Apoptose ist ein energieabhängiger Prozess, der genau gesteuert wird. Es sind drei Wege bekannt, die zum apoptotischen Zelltod führen. Diese Wege sind der rezeptorabhängige extrinsische Weg, der auch für die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ relevant ist, der rezeptorunabhängige intrinsische Weg, der durch Vindesin aktiviert werden kann, und der T-Zell-abhängige Perforin/ Granzyme Weg [192]. Sie führen zur Aktivierung der Caspase 3 und so zum ausführenden Weg der Apoptose (execution pathway).

Der extrinsische Apoptoseweg ist im Gegensatz zum intrinsischen Weg rezeptorabhängig. Zu diesen Rezeptor-/ Ligandenpaaren gehören FasR/FasL, $\text{TNFR1}/\text{TNF}\alpha$ oder DR4/Apo2L(TRAIL) [193]. Die Ligandenbindung an den Rezeptor führt zur intrazellulären Bindung von Adapterproteinen (z.B. $\text{TNFR1}/\text{TNF}\alpha$ bindet TRADD und im weiteren Verlauf FADD und RIP, FasR/FasL bindet FADD). Über die sogenannte Todesdomäne (death domain) erfolgt die Bindung von Procaspase 8 und die Ausbildung des DISC-Komplexes (death-inducing signaling complex) wodurch die Procaspase autokatalytisch aktiviert wird [194, 195]. Die aktive Caspase 8 führt zum Ablauf des ausführenden Apoptoseweges, indem sie Caspase 3 aktiviert. Die Bindung von c-Flip an FADD und Caspase 8 führt zur Inhibition der Apoptose nach Ligandenbindung an die entsprechenden Rezeptoren [196] und stellt einen Regulationsmechanismus der extrinsischen Apoptose dar.

Über den intrinsischen Apoptoseweg wird der Zelltod aufgrund von nicht Rezeptor-vermittelten Signalen ausgelöst [192]. Zu diesen Signalen gehören Toxine (wie z.B. Chemotherapeutika), Strahlung, Hyperthermie, Hypoxy, aber auch das Fehlen von benötigten Wachstumsfaktoren kann den intrinsischen Apoptoseweg auslösen. Durch

den intrinsischen Weg wird u.a. Cytochrom c durch die MPT-Poren aus den Mitochondrien frei, welches mit Apaf-1 und der Procaspase 9 das Apoptosom bildet [197]. Das vollständige Apoptosom führt zu einer starken Aktivitätssteigerung der Caspase 9 (bis zu 2000-fach), was im Folgenden zur Aktivierung der Ausführungsphase der Apoptose durch Caspase 3-Aktivierung führt [198]. Neben Cytochrom c werden auch Proteine wie Smac/DIABLO oder Proteasen freigesetzt, die die Aktivität von Apoptoseproteininhibitoren (IAPs) hemmen [198]. Während der späten intrinsischen Apoptose werden Proteine (AIF, Endonuklease G, CAD) aus den Mitochondrien frei, die nach Translokation in den Zellkern zur DNA-Fragmentierung führen. Dafür muss CAD durch Caspase 3 aktiviert werden, die Aktivität von AIF und Endonuklease G ist caspaseunabhängig [192]. Dieser Apoptoseweg wird durch Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie kontrolliert. Dazu gehören 25 Proteine, die sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken können [199]. Sie beeinflussen die Membranpermeabilität der Mitochondrien und sind so an der Steuerung der Cytochrom c-Freisetzung beteiligt. Durch die Aktivität dieser Proteine kann die Zelle die Apoptose antreiben oder abbrechen. Zu den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen gehören u.a. Bcl-2, Bcl-x und Bcl-XL. Zu den proapoptotischen Bcl-2-Proteinen zählen z.B. Bax, Bak, Bid und Bad. Die Aktivität der Bcl-2-Proteine wird u.a. durch den Tumorsuppressor p53 kontrolliert [200]. Der Fakt, dass p53 sehr häufig in Krebszellen mutiert ist, weist darauf hin, wie wichtig eine Kontrolle der Apoptose ist, um eine unkontrollierte Zellproliferation zu verhindern [192].

In einem rezeptorunabhängigen Apoptoseweg leiten zytotoxische T-Zellen (CTL) mit Hilfe des Perforin/ Granzyme Weges die Apoptose von z.B. virusinfizierten Zellen ein. Diese CTLs sezernieren Perforin, welches Poren in der Membran der Zielzellen bildet [201]. Durch diese Poren gelangen die Proteasen Granzyme A und B in die Zielzelle, wo sie u.a. die Procaspase 10 und eine spezifische DNase aktivieren, bzw. ICAD inaktivieren und zur Freisetzung von Cytochrom c führen [202, 203]. Durch die Freisetzung von Cytochrom c besteht eine Verbindung zum intrinsischen Apoptoseweg [204]. So wird dann die Caspase 3 aktiviert und die Ausführungsphase der Apoptose eingeleitet. Granzyme A kann auch direkt die Caspase 3 aktivieren [205]. Durch die Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 beginnt der finale Apoptoseweg, der zur vollständigen Entfernung der Zelle aus dem Gewebeverband führt. Diese Caspasen schneiden verschiedene intrazelluläre Substrate und führen so zu den morphologischen Veränderungen (u.a. Zellverkleinerung, Chromatinkondensation, Verdichtung des Zytoplasmas, „Budding“) während der Apoptose [206]. Die Effektorcaspase 3 gilt als wichtigste Effektorcaspase. Sie wird durch die bereits

beschriebenen Initiatorcaspasen 8 (extrinsischer Weg), 9 (intrinsischer Weg) und 10 (Perforin/ Granzyme Weg) aktiviert. Durch die Aktivität von Caspase 3 kommt es zur Chromatinkondensation, da der Inhibitor für CAD ein Substrat für Caspase 3 ist. So wird CAD aktiv und sorgt für die Degradation der DNA. Gelsolin ist ebenfalls ein Substrat für Caspase 3. Das freiwerdende N-terminale Fragment entfernt Aktin-Monomere aus dem Zytoskelett, sodass es schließlich zerstört wird und die Zelle ihre Form verliert [207]. Im späteren Verlauf der Apoptose werden die sterbenden Zellen und Zellfragmente phagozytiert. Signal dafür ist Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran. Es gelangt durch einen unspezifischen Flip Flop-Mechanismus auf die Außenseite der Membran [208]. In gesunden Zellen wird dies durch eine Flippase (Aminophospholipid Translokase) verhindert [209].

Im Gegensatz zur Apoptose wird die Nekrose als weitgehend passiver Vorgang beschrieben. Allerdings ist es möglich, dass ein apoptotischer Vorgang als Nekrose zum Zelluntergang führt, wenn für ein vollständiges Ablaufen der Apoptose nicht ausreichend ATP bzw. Caspasen vorhanden sind [210]. Die Nekrose wird durch starke Zellschädigungen ausgelöst, z.B. durch Toxin-, Strahlen- oder Hitzeexposition. Diese Einflüsse können auch zur Apoptose führen (intrinsischer Weg). Hier entscheiden Dauer der Einwirkung und Dosis der toxischen Noxe über die Aktivierung der Apoptose oder den Ablauf von nekrotischen Prozessen [210]. Da der Begriff Nekrose auch die Prozesse nach dem Zelltod beschreibt, wird zum Teil von Onkose gesprochen [192]. Die Nekrose ist durch das Anschwellen der sterbenden Zellen, Vakuolenbildung und geschädigten Organellen gekennzeichnet [191]. Es kommt zu ausgedehnten, unkontrollierten Membranschäden, die zur Freisetzung von zytoplasmatischen Enzymen führen. Dies führt *in vivo* zu Entzündungsreaktionen. Durch den Verlust der Membranintegrität kann die Apoptose von der Nekrose unterschieden werden. Der Nachweis von zytoplasmatischen Enzymen im Extrazellularraum und die Aufnahme von sonst nicht permeablen Substanzen (z.B. Propidiumiodid) in die Zelle weist auf die Nekrose hin.

Da in der Arbeit für die gentherapeutischen Experimente hTNF α als Transgen zum Einsatz kommt, ist die Analyse möglicher apoptotischer oder nekrotischer Prozesse von besonderer Bedeutung.

Zielstellung

Heute werden für die Gentherapie hauptsächlich virale Vektoren eingesetzt, da sie eine hohe *in vivo* Transfereffizienz zeigen. Es gibt allerdings Sicherheitsbedenken aufgrund von Immunogenität und Mutagenesefähigkeit dieser Vektoren. Als Alternative bietet sich der nicht-virale Gentransfer an. Er gilt als sicherer als der Einsatz von Viren, ist aber bisher Aufgrund der geringen Gentransfereffizienz *in vivo* klinisch nur begrenzt einsetzbar. Die Gentransfereffizienz der nicht-viralen Gentherapie hängt unter anderem von zwei Faktoren ab: von der Gentransfertechnologie und vom verwendeten Vektor. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung, Untersuchung und Optimierung einer nicht-viralen Gentherapie-Strategie sowohl klinisch, als auch *in vitro* und *in vivo*.

Hierzu wurde zunächst die Jet-Injektion als Gentransfertechnologie für den klinischen Einsatz etabliert. In einer klinischen Phase I Studie sollte die Anwendbarkeit und Sicherheit dieser Technologie untersucht werden.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Studie, sollte ein nicht-viraler Vektor gefunden werden, der die Sicherheit und Gentransfereffizienz verbessern kann. Es wurden verschiedene nicht-virale, minimalistische Vektoren mit ihren parentalen, Plasmid-basierten Konstrukten und untereinander in Reporter-genassays verglichen. Es wurde der Mechanismus der optimierten Gentransfereffizienz der neuartigen nicht-viralen Vektoren untersucht.

Das therapeutische Potential des effizientesten Vektors sollte anschließend *in vitro* und *in vivo* analysiert werden. Hierzu wurde hTNF α als Transgen verwendet. Es sollte im Melanommodell untersucht werden, ob der Gentransfer von hTNF α zu einer Sensitivierung gegenüber einer Chemotherapie führt. Weiterhin sollte gezeigt werden, auf welchem Weg der hTNF α -Gentransfer zu dieser Chemosensitivierung führt. In Vorbereitung einer weiteren klinischen Anwendung sollte der Gentransfer des MIDGE-Vektors für die kombinierte Gen- und Chemotherapie hinsichtlich Sicherheit und Effizienz experimentell im Melanommodell untersucht werden.

Abschließend sollten erste Arbeiten weitere Möglichkeiten aufzeigen, die gentherapeutische Anwendung minimalistischer Vektoren weiter zu optimieren. Hierzu wurde der Einsatz der Sleeping Beauty Transposase mit MIDGE-basierten Transposons und die Kombination von Jet-Injektion und Elektroporation *in vivo* in ersten Experimenten untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Vektoren, Vektorherstellung

2.1.1 MIDGE

Das MIDGE-Vektorsystem (Kapitel 1.3.2.) wurde für die Expression der Reportergene Luziferase (Luc), grün fluoreszierendes Protein (Green Fluorescence Protein, GFP), sowie des humanen Tumornekrosefaktor-alpha ($\text{hTNF}\alpha$) Gens und für den Gentransfer des Sleeping Beauty (SB) Transposon/Transposase-Systems *in vitro* verwendet. Darüber hinaus wurden die $\text{hTNF}\alpha$ - und Luc-kodierenden Vektoren für den intratumoralen *in vivo* Gentransfer eingesetzt. Die MIDGE-Vektoren MIDGE-Luc, MIDGE-GFP und MIDGE- $\text{hTNF}\alpha$ und ihre parentalen Plasmide wurden von der Mologen AG (Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Konstrukte und ihre grundlegenden Eigenschaften werden in Tabelle 2 zusammengefasst. Das parentale Plasmid pMok- $\text{hTNF}\alpha$ wurde in unserer Arbeitsgruppe generiert. Alle Konstrukte wurden hochrein und endotoxinfrei hergestellt.

Vektor	Größe	Eigenschaften
pMok-Luc	4,4 kb	parentales Plasmid, CMV-Luc Expressionskassette, Plasmidrückgrat
MIDGE-Luc	2,8 kb	linearer MIDGE-Vektor, CMV-Luc Expressionskassette, kein Plasmidrückgrat
pMok-GFP	3,5 kb	parentales Plasmid, CMV-GFP Expressionskassette, Plasmidrückgrat
MIDGE-GFP	1,9 kb	linearer MIDGE-Vektor, CMV-GFP Expressionskassette, Plasmidrückgrat
pMok- $\text{hTNF}\alpha$	3,5 kb	parentales Plasmid, CMV- $\text{hTNF}\alpha$ Expressionskassette, Plasmidrückgrat
MIDGE- $\text{hTNF}\alpha$	1,9 kb	linearer MIDGE-Vektor, CMV- $\text{hTNF}\alpha$ Expressionskassette, kein Plasmidrückgrat

Tabelle 2: Verwendete MIDGE-Vektoren

2.1.1.1 MIDGE-Synthese des Sleeping Beauty (SB) Transposase/Transposon-Systems

Die SB-tragende Expressionskassette CMV-SB und die Transposonstruktur mit der Kassette caggs-amaxaGFP wurden PCR-amplifiziert (Primer siehe Tabelle 3, PWO Master, Roche, Mannheim, Deutschland) bzw. mit Hilfe von BamHI (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) ausgeschnitten. Die in Tabelle 4 gelisteten Plasmide pCMV(CAT)T7-SB100X und pt2-caggs-amaxaGFP dienten als Template. Die mit Hilfe der PCR eingefügten Restriktionsorte für NsiI und NheI (Fermentas) wurden nach der PCR verdaut. Die verwendeten „FastDigest“ Enzyme wurden für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden kurze Hairpins (Tabelle 3, Biotez, Berlin, Deutschland) mit Hilfe von T4 DNA-Ligase (Fermentas) über Nacht bei 16°C an die Überhänge ligiert. Sie wurden in hohem (80x) molarem Überschuss eingesetzt. Nicht vollständig verschlossene Konstrukte wurden mit Exonuklease III (Fermentas) degradiert. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe 1%-iger Agarosegele und dem Spin DNA Extraction Kit (Invitex, Berlin, Deutschland) nach Herstellerangaben. Die MIDGE-Vektoren (Tabelle 4) wurden in ddH₂O aufgenommen und photometrisch quantifiziert (Nanodrop, Peqlab). In der kommerziellen Produktion wird oft Eco31I als Restriktionsenzym verwendet, um die Enden für die Ligation der Hairpins zu erhalten, da es nicht-kompatible Enden generieren kann [211]. So wird eine Selbstligation ausgeschlossen.

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'
NsiI SB fw	GT GATGCAT GTGATCTTCCGTCACAGGT
NheI SB rev	TAGCT GCTAGC TATGCTTCCGGCTCGTATG
BamHI Hairpin	P-GATCCGCGTCTTTTGACGCG
NsiI Hairpin	P-CGCGTCTTTTGACGCGT GCA
NheI Hairpin	P-CTAGGCGCAGTTTCTGCGC

Tabelle 3: Die für die MIDGE-Synthese verwendeten Oligonukleotide

Die Primer sind unmodifiziert und fügen Restriktionsorte (fett) in das PCR-Produkt ein. Die Hairpins besitzen ein 5'-Phosphat (P), um für die Ligation zur Verfügung zu stehen. Die vier Thymidine bilden den Loop, der Überhang ist kursiv markiert.

Vektor	Größe	Eigenschaften
pCMV(CAT)T7-SB100X	4,8 kb	parentales Plasmid, CMV-SB100x Expressionskassette, Plasmidrückgrat
MIDGE-SB100x	2,3 kb	linearer MIDGE-Vektor, CMV-SB100x Expressionskassette, kein Plasmidrückgrat
pt2-caggs-amaxaGFP	5,6 kb	parentales Plasmid, chim. caggs Fusionspromotor-amaxaGFP Expressionskassette, Plasmidrückgrat
MIDGE-amaxaGFP	2,7 kb	linearer MIDGE-Vektor, chim. caggs Fusionspromotor-amaxaGFP Expressionskassette, kein Plasmidrückgrat

Tabelle 4: Die verwendeten Sleeping Beauty-Vektoren

2.1.2 Minicircle

Die Minicircle-Vektoren (MC) und ihre parentalen Plasmide wurden von der PlasmidFactory GmbH & Co. KG (Bielefeld, Deutschland) zur Verfügung gestellt, da für ihre Generierung ein spezifischer Herstellungsprozess (Rekombination, siehe 1.3.1) verwendet wird (Tabelle 5). Die Minicircles werden in einem *in vivo* Rekombinationsprozess hergestellt und danach von verbliebenen parentalen Plasmiden und Miniplasmiden isoliert. Auch für den Gentransfer der Minicircles und der jeweiligen parentalen Plasmide wurden ausschließlich hochreine und endotoxinfreie Präparationen verwendet. Die Qualität und Identität der Plasmid- und Minicircle-Vektoren wurde von PlasmidFactory im Rahmen der Produktion kontrolliert und bestätigt.

Vektor	Größe	Eigenschaften
pf461	6,2 kb	parentales Plasmid, CMV-Luc Expressionskassette, Plasmidrückgrat
MC-Luc pf700	3,9 kb	Minicircle aus pf461, CMV-Luc Expressionskassette, kein Plasmidrückgrat
pf463	3,5 kb	parentales Plasmid, CMV-GFP Expressionskassette, Plasmidrückgrat
MC-GFP pf699	2,3 kb	Minicircle aus pf463, CMV-GFP Expressionskassette, kein Plasmidrückgrat

Tabelle 5: Verwendete Minicircle-Vektoren

2.1.3 pCMV β

Der Plasmid-Vektor pCMV β kodiert für die *Escherichia coli* β -Galactosidase unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors und eines SV40 polyA-Signals. Dieser nicht-virale Vektor wurde im Rahmen der klinischen Phase I Studie als Reportergenvektor verwendet. Dieser Vektor enthält neben der Expressionkassette Sequenzen für die Expression eines bakteriellen Resistenzgens (Ampicillin) und einen Replikationsursprung (origin of replication, ORI). So werden neben der Expressionkassette rund 3 kb genetisches Material übertragen, das für die eukaryotische Genexpression nicht notwendig ist.

Das Plasmid pCMV β wurde von PlasmidFactory und Eurogentec unter GMP-Bedingungen als Prüfpräparat hergestellt. Die Master Cell Bank (MCB) wurde von PlasmidFactory generiert, die weitere Herstellung und GMP-gerechte Abfüllung wurde von Eurogentec übernommen. Im Rahmen der GMP-Produktion wurden alle Schritte protokolliert und dokumentiert. Die Identität der MCB und der Working Cell Bank (WCB) und der produzierten Vektoren wurde mehrfach kontrolliert und bestätigt.

Abschließend erfolgte eine Qualitätskontrolle nach den Richtlinien der European Medicines Agency (EMA). Die für die Verwendung zu bevorzugende ccc-Topologie (covalently closed circular) der DNA wurde mit Kapillargelelektrophorese bestätigt.

2.2 Lagerung

Die Lagerung der Vektoren erfolgte bei -80 °C aliquotiert mit einer Konzentration von 1 mg Vektor pro ml Wasser. Wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen wurden vermieden, um die Topologie der DNA nicht zu stören. Die MIDGE-Vektoren für die präklinische toxikologische Untersuchung wurden kurz vor der Studie generiert und bei -80 °C gelagert.

Das Prüfpräparat pCMV β wurde als Einzeldosis kurz vor der Verwendung geliefert und bis zum Einsatz im Rahmen der klinischen Phase I Studie bei -20 °C unter kontrollierten Bedingungen gelagert.

2.3 Zellkultur

Alle in der Arbeit verwendeten humanen Zelllinien wurden in einem Zellkulturinkubator bei 37 °C, 5% CO₂ kultiviert. Ihre grundlegenden Eigenschaften und Kulturbedingungen werden in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Zelllinien sind kommerziell verfügbar (ATCC-LGC, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland). Die Authentizität der Linien wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) überprüft und bestätigt. Es wurden Zellen in niedrigen Passagen verwendet und bei Bedarf durch frische Zellen ersetzt. Für die *in vivo* Xenograft-Tumore wurden immer frische Kulturen verwendet.

Zelllinie	Herkunft, Entität	Morphologie,	ATCC Nummer	Medium
A375	human, epithelial, Melanom		CRL-1619	DMEM, 4,5 g/l Glukose, 10% FKS
MeWo	human, Fibroblast, Melanom		HTB-65	DMEM, 4,5 g/l Glukose, 10% FKS
SKMEL-5	human, stellate, Melanom		HTB-70	RPMI 1640, 10% FKS
SK-MEL-28	human, polygonal, Melanom		HTB-72	RPMI 1640, 10% FKS
HCT 116	human, epithelial, kolorektales Karzinom		CCL-247	RPMI 1640, 10% FKS
SW480	human, epithelial, kolorektales Adenokarzinom		CCL-228	RPMI 1640, 10% FKS

Tabelle 6: Die verwendeten Zelllinien

Die Zellen wurden in Medium (PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich) mit 10% FKS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) als Supplement kultiviert (Tabelle 6). Alle Zelllinien wurden 1-2x pro Woche in einem Splitting-Verhältnis von 1:4-1:10 passagiert. Dafür wurden die Zellen mit PBS (PAA) gewaschen, trypsinisiert (Trypsin/EDTA (PAA), 5-15 Minuten 37 °C), abzentrifugiert (5 Minuten 1000 rpm) und anschließend in Zellkulturflaschen eingesät. Es wurden keine Antibiotika oder weitere Supplemente verwendet. Ein PCR-basierter Mykoplasmentest wurde regelmäßig durchgeführt [212]. Zellzählungen wurden mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (Countess, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen 1:2 in Trypanblau (0,4%) verdünnt und davon 10 µl für die Zählung eingesetzt. Die Zellkulturgefäße, wie Flaschen (T25-T150), Multiwellplatten etc. wurden von BD (Franklin Lakes, NJ USA), Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland), TPP (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.3.1 Gentransfer *in vitro*

Der vergleichende Gentransfer der verschiedenen Vektoren wurde mit Hilfe von *in vitro* Transfektionen und Elektroporationen durchgeführt. Für die Transfektion wurde Metafectene (Biontex Laboratories GmbH, Martinsried, Deutschland) verwendet. Es kann im Gegensatz zu anderen Transfektionsreagenzien für alle verwendeten Zelllinien eingesetzt werden. Die trypsinisierten und gewaschenen Zellen wurden auf eine Zelldichte von 1×10^5 /ml eingestellt. Für die Transfektion im 24-Well Format wurde die DNA in 20 µl DMEM ohne FKS und Phenolrot gelöst. Vom größten Plasmid (pf461) wurden 500 ng verwendet. Die anderen Vektoren wurden äquimolar dazu eingesetzt und die fehlende DNA Menge mit einem Leervektor ersetzt. Das Transfektionsreagenz Metafectene (1,1 µl) wurde ebenfalls in 20 µl DMEM gelöst. Die Bestandteile des Transfektionsansatzes (DMEM, Metafectene, Vektor) können in Abhängigkeit von der Wellfläche skaliert werden. Beide Lösungen wurden vorsichtig gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung zu den Zellen gegeben und weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend ausgesät. Dabei wurden 500 µl der Zellsuspension plus Transfektionslösung im 24-Well Format eingesetzt.

Für die Elektroporation wurde der Gene Pulser Xcell Elektroporator von Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet. Es wurden 800 µl einer Zellsuspension mit 5×10^6 Zellen/ml mit 10 µg DNA (pf461) gemischt und in einer 4 mm

Küvette (Bio-Rad Laboratories GmbH) elektroporiert (200 V, 1x20 ms Squarewavepuls). Mehr als 90% der eingesetzten Zellen bleiben bei diesen Bedingungen vital. Die Vektoren wurden auch hier äquimolar eingesetzt und die DNA Menge mit Hilfe eines Leervektors konstant gehalten. Nach der Elektroporation wurden die Zellen auf eine Dichte von 1×10^5 /ml eingestellt und wie oben beschrieben ausgesät.

2.3.2 *In vitro* Vindesinbehandlung

Die Vindesinbehandlung nach Chemosensitivierung mit Hilfe von hTNF α erfolgte 24 h nach Gentransfer. Das Vindesin wurde als 2x konzentrierte Lösung in Medium als serielle Verdünnung vorbereitet. Es wurde anschließend 1:2 im Kulturwell durch Zugabe des bereits vorhandenen Volumens auf die benötigte Konzentration verdünnt. Die Pipettierschritte erfolgten bei reduziertem Licht.

2.3.3 MTT-Assay

Nach dem Gentransfer mit Hilfe von Transfektion und Elektroporation wurde die Zellvitalität und die Zytotoxizität von hTNF α in Kombination mit Vindesin *in vitro* mit dem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Carl Roth Karlsruhe, Deutschland) Assay untersucht. Im 96-Well Format wurden 1×10^4 Zellen ausgesät. Nach 96 h wurden 10% des Kulturvolumens MTT (5 mg/ml in PBS, sterilfiltriert; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 150 μ l DMSO (Carl Roth) gelöst. Dabei geht das gebildete violette Formazansalz in Lösung. Die Messung erfolgte im Tecan Spectrafluor Plus mit einem 560 nm Filter (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) und der Software Magellan 3.0. Die Auswertung erfolgte relativ zu einer unbehandelten Kontrolle in Triplikaten. Mathematische Analysen (IC₅₀ Bestimmung, Signifikanzen) wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) und SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., Erkrath, Deutschland) durchgeführt.

2.3.4 LDH-Assay

Die Laktatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung nach der Vindesinbehandlung wurde mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit (Roche) relativ zu einer unbehandelten Kontrolle

bestimmt. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die zellfreien Überstände der Kulturen im 96-Well Format wurden zu definierten Zeitpunkten gesammelt. Es wurden 1×10^4 Zellen eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ein Zelllysat von 1×10^4 A375 Zellen. Dieses Lysat zeigte die maximale Menge an LDH von 1×10^4 Zellen an. Es wurde Vindesin mit einer finalen Konzentration $c = IC_{50}$ verwendet. Die Messung erfolgte bei 492nm mit Leerwertreduktion im Tecan Spectrafluor Plus. Die Auswertung erfolgte relativ zu einem unbehandelten Zelllysat.

2.3.5 Caspase-Glo Apoptose Assay

Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 bzw. 8 und 9 wurde mit den Apoptose-Glo Assay Kits (Promega) bestimmt. Diese Kits stellen ein Caspasesubstrat zur Verfügung, aus dem durch aktive Caspasen Luziferin freigesetzt wird. Für die Vindesinbehandlung wurde die Konzentration $c = IC_{50}$ verwendet. Für die Bestimmung der Caspase 8 und 9 Aktivität wurde dem Substrat der Proteasominhibitor MG-132 zugesetzt. Für die Messung wurden die Substratlösungen 1:1 (vol:vol) eingesetzt. Die Lumineszenz wurde im Tecan Spectrafluor Plus nach 1 h Inkubation detektiert. Die Auswertung erfolgte relativ zur Caspaseaktivität zum Beginn des Versuchs.

2.4 Expressionsanalysen auf RNA- und Proteinebene

2.4.1 RNA-Isolation

Um die Expression der Transgene Luc (*in vitro* Gentransfer), hTNF α (intratumoraler Gentransfer in A375-Tumore im Mausmodell) und LacZ (intratumoraler Gentransfer in Patiententumore im Rahmen der klinischen Phase I Studie) auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde die total-RNA mit Hilfe von TRIzol Reagent (Invitrogen) isoliert. Es stellt eine kommerziell erhältlich Variante des Protokolls von Chomczynski und Sacchi dar [213, 214]. Die Tumorproben (Kryopräparate) der klinischen Studie und der Tierexperimente wurden im Kryomikrotom Leica CM1900 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) geschnitten. Im Rahmen der klinischen Phase I Studie wurden Tumorfraktionen gesammelt, die jeweils ca. 200 μ m Tumorquerschnitt abbilden. In den *in vitro* Experimenten wurden die Zellen direkt im Well lysiert. Die Zugabe von 1ml Trizol führt zu einer effizienten Lyse, sodass keine weiteren Schritte zum Aufschluss nötig waren. Durch Chloroformzugabe wird eine Trennung in organische Phase (enthält u.a. die Proteine), eine Interphase (enthält die DNA) und eine wässrige Phase (RNA) erreicht. Die organische Phase und die Interphase, die nach der ersten

Phasentrennung anfallen, wurden für die Isolation von DNA und Proteinen verwendet (klinische Studie). Nach dem Fällern (Isopropanol), Waschen (75% Ethanol) und Trocknen der RNA der wässrigen Phase wurde ein DNaseI-Verdau (Roche) durchgeführt, um die verbliebenen Vektoren aus der RNA zu entfernen, die aufgrund ihrer geringen Größe in der wässrigen Phase verbleiben. Nach dem DNaseI-Verdau der RNA wurde das Volumen mit ddH₂O auf 500 µl vergrößert und erneut durch Zugabe von Chloroform eine Phasentrennung erreicht. Die RNA in der wässrigen Phase wurde mit Isopropanol gefällt, in 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in ddH₂O gelöst. Die Quantifizierung der isolierten RNA erfolgte im Nanodrop (PeqLab).

2.4.2 Reverse Transkription

Um die Expression der Transgene auf mRNA-Ebene nachzuweisen und zu quantifizieren, wurden jeweils 50 ng der isolierten total-RNA revers transkribiert. Alle Reagenzien wurden von Applied Biosystems (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) bezogen (Tabelle 7). Für die reverse Transkription wurden die verschiedenen Reagenzien wie in Tabelle 7 dargestellt, eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem T3000 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Sie besteht aus Primerbindung (25 °C, 3 Minuten), reverser Transkription (42 °C, 45 Minuten) und Inaktivierung des Enzyms (95 °C, 5 Minuten). Die so hergestellte cDNA wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Reagenz	Volumen	Finale Konzentration
PCR Puffer II 10x	2 µl	1x
MgCl ₂ 25 mM	4 µl	5 mM
dNTPs (10 mM)	2 µl pro dNTP	1 mM pro dNTP
Random Hexamere(50 µM)	1 µl	2,5 µM
RNase Inhibitor(20 U/µl)	1 µl	1 U/µl
MuLV reverse Transkriptase (50 U/µl)	1 µl	2,5 U/µl
RNA Template 16,6 ng/µl	3 µl	2,5 ng/µl

Tabelle 7: Master Mix für die reverse Transkription (RT)

2.4.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) für den mRNA-Nachweis

Die quantitative Real-Time PCR wurde mit Hilfe des Roche LightCycler 480 im 96-Well Format durchgeführt. Die Reaktionen hatten ein Gesamtvolumen von 10 µl. Für die Quantifizierung der Transgenexpression von Proben aus den *in vitro* Experimenten (Gentransfer in Zelllinien) wurde der GoTaq qPCR Master Mix (Promega) nach

Herstellerangaben mit 1mM MgCl₂ benutzt. Die PCR-Bedingungen waren: Initiale Denaturierung 2 Minuten, Denaturierung 10 s, Primerbindung 10 s, Polymerisation 10 s, 45 Zyklen. Im Anschluss erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse zur Verifizierung der Produktbildung. Für alle anderen Proben wurde der LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche) verwendet. Die Oligonukleotid- und Sondensynthese erfolgte durch Tib Molbiol (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Deutschland). Das Housekeeping-Gen Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) wurde immer mit dem LightCycler h-G6PDH Housekeeping Gene Set (Roche) und dem Roche Reaktionsmix für Hybridisierungssonden quantifiziert. Als Standard diente eine serielle Verdünnungsreihe (Verdünnung: RNA 1:2) eines positiven Klon, die während des gesamten Experiments beibehalten wurde. Die PCR-Bedingungen waren: Initiale Denaturierung 15 Minuten, Denaturierung 10 s, Primerbindung 20 s, Polymerisation 10 s, 45 Zyklen. Die Temperatur für die Primerbindung ist zusammen mit den Sequenzen in Tabelle 8 aufgeführt. In jeder PCR wurden 2 µl Template eingesetzt. Die Primer hatten eine finale Konzentration von 0,5 µM, die Sonden von 0,3 µM.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Temperatur
LacZ RNA fw	CCGTTGATGTTGAAGTGGC	62 °C
LacZ RNA rev	CTAATCCGAGCCAGTTTACCC	62 °C
LacZ RNA FITC	GCGCGGATTGGCCTGAACT	---
LacZ RNA LCRed640	CAGCTGGCGCAGGTAGCAGA	---
Luc fw	GGGCTCACTGAGACTACATC	62 °C
Luc rev	GTAGCCATCCATCCTTGTC	62 °C
TNF α fw	CTCTGGCCCAGGCAGTCAGA	61 °C
TNF α rev	TCGGCAAAGTCGAGATAGTC	61 °C
TNF α FITC	GCATTGGCCCGGCGGTTC	---
TNF α LCRed640	CCACTGGAGCTGCCCCTCAGCT	---

Tabelle 8: Die für die qRT PCR verwendeten Oligonukleotide

Die Primer sind unmodifiziert, die Sonden sind mit 3'-FITC bzw. 5'-LCRed640 modifiziert.

2.4.4 Luziferase Assay

Die Firefly Luziferase (Glühwürmchen) wurde als Reportergen in den jeweiligen Vektoren für die Expressionsanalysen im *in vitro* Gentransfer eingesetzt. Die Aktivität nach äquimolarer Transfektion bzw. Elektroporation wurde mit Hilfe des Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega) untersucht. Das im Kit enthaltene Luziferase-Substrat (Luziferin) wurde nach Herstellerangaben im Puffer gelöst. Da dieser Assay pH-abhängig ist, wurde das Kulturmedium durch frisches DMEM mit 10% FKS ersetzt. Das Substrat wurde in der gleichen Menge wie das zugegebene Medium eingesetzt.

(200 μ l Medium + 200 μ l Substrat im 24-Well Format). Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 100 μ l in Duplikat in 96-Well Lumineszenzplatten überführt und im Tecan Spectrafluor Plus wurde die Lumineszenz detektiert (Exposition 1000 ms, Gain 150). Die Hintergrundlumineszenz wurde subtrahiert. Dargestellt wird die Veränderung des Luziferasesignals relativ zum Plasmid pf461, da dies der größte verwendete Vektor ist.

2.4.5 FACS Analyse

Für die Bestimmung des Anteils Transgen-positiver Zellen nach äquimolarem Gentransfer *in vitro* wurde GFP in den jeweiligen zu vergleichenden Vektoren als Transgen verwendet. Nach Gentransfer (Kapitel 2.3.1) im 12-Well Format wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in 500 μ l PBS aufgenommen, um sie anschließend im FACS zu untersuchen. Für die Messungen wurde ein FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) mit der Software BD CellQuest Pro 5.2 verwendet. Die jeweilige untransfizierte Zelllinie diente als Referenz. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo 7.6 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Es wurde die Zunahme der GFP-positiven Zellen relativ zur Kontrolle angegeben.

2.4.6 hTNF α Elisa

Humanes TNF α aus Zellkultur- bzw. Tumorproben der Tierexperimente wurde mit dem TNF α human ELISA Kit (Invitrogen) quantifiziert. Zellkulturüberstände wurden nach äquimolarem Gentransfer gesammelt und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Der hTNF α -Gehalt der Überstände (sezerniertes hTNF α) wurde als Konzentration pro ml angegeben. Xenotransplantat-Tumore der humanen Zelllinie A375 wurden nach äquimolarem intratumoralen Gentransfer mit Hilfe der Jet-Injektion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Kryomikrotom (Leica CM1900) geschnitten und in RIPA Lysepuffer (Kapitel 2.4.7) aufgenommen. Der hTNF α -Gehalt der Tumorproben wurde auf das eingesetzte Gesamtprotein normalisiert. Humanes TNF α aus Blutproben der Tierexperimente wurde mit dem TNF α Human Ultrasensitive ELISA Kit (Invitrogen) detektiert.

2.4.7 Protein-Isolation

Die Tumorproben aus den Tierexperimenten wurden schockgefroren und mit Hilfe eines Kryomikrotoms (Leica CM1900) seriell geschnitten um das Gesamtprotein zu isolieren. Die entstandenen Fraktionen wurden in RIPA Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,25% Na-Deoxycholate, 1 mM PMSF, 1 Tablette cOmplete mini Proteaseinhibitorenmix, Roche) aufgenommen. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4 °C wurden die Lysate bei 14000 rpm, 30 Minuten und 4 °C zentrifugiert, um unlösliche Zelltrümmer zu entfernen. Die Quantifizierung des Gesamtproteingehaltes erfolgte mit Hilfe von Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA, Kapitel 2.4.8).

Das Gesamtprotein aus den Tumorproben der klinischen Gentransferstudie wurde aus der organischen Phase nach der ersten Phasenseparation im Verlauf der RNA-Isolation (Kapitel 2.4.1) gewonnen. Die wässrige Phase wurde für die Isolation der RNA verwendet. Zunächst wurde die DNA der Interphase mit 300 µl Ethanol pro ml Trizol gefällt (Kapitel 2.5.1.1). Die Proteine des verbleibenden Überstands konnten durch Zugabe von 1,5 ml Isopropanol pro ml Trizol gefällt werden. Nach Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proteine bei 12000 rpm pelletiert. Die gefällten Proteine wurden 3-mal in 95% Ethanol 0,3 M Guanidinhydrochlorid gewaschen. Für jeden Waschschrift wurden die Pellets 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 7500x g gefällt. Der finale Waschschrift erfolgte in 96% Ethanol für 20 Minuten. Anschließend wurden die Proteine erneut bei 7500x g gefällt und im Vakuum getrocknet. Die Proteine konnten in 1% SDS (Carl Roth) in H₂O gelöst werden. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 10000x g entfernt. Die Quantifizierung musste aufgrund des SDS mit dem BCA Protein Assay Reagent (bicinchoninic acid, Pierce) erfolgen, da Coomassie nicht mit größeren Mengen SDS kompatibel ist.

2.4.8 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgte mit dem Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay (Pierce) nach Herstellerangaben. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) im Bereich von 25-2000 µg/ml. Die Proben wurden so verdünnt, dass sie im linearen Bereich der Eichkurve liegen und dann im 96-Well Format vermessen. Dafür wurden 100 µl verdünnte Probe mit 100 µl Coomassie 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gemessen. Die Quantifizierung erfolgte bei 620 nm im Tecan Spectrafluor Plus und der Software

Magellan 3.0. Die Werte der Leerkontrolle wurden von den Messwerten abgezogen. Die Proteinquantifizierung mit dem BCA Protein Assay Reagent (Pierce) erfolgte nach Herstellerangaben. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) im Bereich von 20-2000 µg/ml. Die Proteine wurden vorverdünnt und mit der Arbeitslösung bei 37 °C, 30 Minuten inkubiert. Es wurden 25 µl Probe bzw. Standardverdünnung mit 200 µl Arbeitslösung verwendet. Die Messung erfolgte im Tecan Spectrafluor Plus bei 560 nm.

2.4.9 Western Blot

Die isolierten Proteine (30 µg Gesamtprotein) wurden mit Hilfe 10%-iger Acrylamidgele aufgetrennt (Invitrogen; 180 V, 1 h in MES Puffer). Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine bei 20 V, 50 Minuten auf Nitrocellulosemembranen (Hybond C, GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland; Trans-Blot SD, Bio-Rad). Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen Ponceau S gefärbt, um den Proteintransfer zu überprüfen. Nach Waschen und Blockieren der Membran (Waschpuffer: TBST, Blockpuffer: 5% fettfreies Milchpulver in TBS) erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern (Maus-anti-β-Galactosidase, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA, 1:1000 in 5% BSA Fraktion V TBST; Ziege-anti-Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA, 1:500 in 5% BSA Fraktion V TBST) über Nacht bei 4 °C. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern (anti-Maus-HRP 1:8000, Santa Cruz sc-7076, anti-Ziege-HRP 1:5000, Santa Cruz sc-2354) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Für die Detektion wurde ein Peroxidase Substrat verwendet (100 mM Tris-HCl pH 8,6, 250 µg/ml Luminol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, 11 µg/ml para-Hydroxycoumarinsäure, Sigma-Aldrich, 0,01% H₂O₂). Die Chemilumineszenz wurde mit Kodak X-Omat Filmen (Sigma-Aldrich) aufgenommen.

2.4.10 X-Gal-Färbung

Die X-Gal-Färbung wurde an 7 µm Kryodünnschnitten durchgeführt. Die Tumorsektate der Patienten der klinischen Studie wurden bei -20 °C im Kryomikrotom geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Nach der Fixierung (2% Formaldehyd, 10 Minuten 4 °C) wurden die Slides gewaschen und mit dem X-Gal-Mix (1 mg/ml X-Gal, 1 mM MgCl₂, 3 mM K₃Fe(CN)₆, 3 mM K₄Fe(CN)₆, 24 h, 37 °C) inkubiert. Dabei entwickelt sich die Blaufärbung der β-Galactosidase-positiven

Bereiche. Anschließend wurden die Objektträger gewaschen und in wässrigem Mounting Medium (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) eingeschlossen. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland) angefertigt.

2.4.11 Immunhistochemischer β -Galactosidase Nachweis

Für den immunhistochemischen β -Galactosidase Nachweis in den Tumorproben der klinischen Studie wurden ebenfalls 7 μ m Kryodünnschnitte verwendet. Die Schnitte wurden 30 Minuten an der Luft getrocknet und in gepuffertem Glutaraldehyd (NKH-Puffer, 10 mM Hepes pH 8, 0,04% Glutaraldehyd, 1% Glukose) fixiert. Danach wurden die Schnitte bei Raumtemperatur 10 Minuten permeabilisiert (0,5% Triton X-100, 2,5% BSA Fraktion V in PBS), mit 1% H_2O_2 in PBS inkubiert und blockiert (1,25% BSA Fraktion V in PBS). Der primäre Antikörper anti- β -Galactosidase ab616 (1:1500; Abcam, Cambridge, England) wurde bei 4 °C über Nacht, der sekundäre anti-Kaninchen-Antikörper-HRP ab6721 (1:500; Abcam) wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Als Substrat für die Peroxidase des sekundären Antikörpers wurde das DAB-Färbesystem (Dako) verwendet (2 Minuten Raumtemperatur, anschließend mit H_2O waschen). Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämaunlösung (Carl Roth, waschen mit H_2O). Die Schnitte wurden abschließend in Glycergel (Dako) eingebettet.

2.5 Vektorquantifizierung

2.5.1 Vektor-Isolation

2.5.1.1 DNA-Isolation aus Patientenmaterial

Im Rahmen der klinischen Phase I Studie wurde der pCMV β Plasmid-Vektor aus der organischen Phase bzw. Interphase isoliert (Kapitel 2.4.1), die bei der RNA-Isolation anfielen. Die DNA dieser Phasen wurde mit Hilfe von Ethanol (300 μ l Ethanol/ml Trizol) gefällt und anschließend bei max. 2000x g pelletiert. Der Überstand wurde für die Protein-Isolation verwendet. Die DNA wurde zweimal 30 Minuten mit 0,1 M Natriumcitrat in 10% Ethanol gewaschen. Die Zentrifugation zwischen den Schritten erfolgte bei max. 2000x g. Der finale Waschschrift erfolgte in 75% Ethanol. Nach erneuter Zentrifugation wurde die DNA an der Luft getrocknet und in H_2O über Nacht bei 4 °C gelöst. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Nanodrop (Pqlab).

2.5.1.2 DNA-Isolation aus Blut

Der pCMV β Plasmid-Vektor im EDTA-Blut der behandelten Patienten wurde mit dem Jetquick Blood Mini Kit (Genomed, Löhne, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde direkt nach der Blutabnahme isoliert. Anschließend wurde sie in H₂O aufgenommen und mit Hilfe des Nanodrop (Pqclab) quantifiziert.

2.5.1.3 DNA-Isolation aus Xenograft-Tumoren

Die in den Tierexperimenten verwendeten MIDGE-Vektoren wurden mit dem NucleoSpin Tissue Kit (Macherey & Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Die schockgefrorenen Tumore wurden im Kryomikrotom seriell geschnitten und im Lysepuffer aufgenommen. Die isolierte DNA wurde in H₂O aufgenommen und mit dem Nanodrop (Pqclab) quantifiziert.

2.5.1.4 DNA-Isolation aus Zellkernen

Die DNA aus den *in vitro* Gentransferexperimenten wurde mit dem NucleoSpin Tissue XS Kit (Macherey & Nagel) nach Herstellerangaben isoliert. Da die Transkription im Zellkern abläuft, wurden die Zellkerne für die Vektorquantifizierung verwendet. Zuvor wurde ein DNaseI Verdau (DNaseI, Roche) durchgeführt, um extrazelluläre Vektorkontaminationen zu degradieren. Die Isolation der nukleären Fraktion erfolgte mit dem NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Pierce). Die Zellen wurden nach dem pelletieren in 100 μ l CER I Puffer aufgenommen. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte die Lyse durch Zugabe von 5,5 μ l CER II. Die Kerne wurden anschließend pelletiert und für die DNA-Isolation verwendet.

2.5.2 Quantitative Real-Time PCR (qPCR) für den Vektornachweis

Die quantitative Analyse der isolierten Gentransfervektoren erfolgte im LightCycler480 (Roche) im 10 μ l Maßstab. Die Reaktionsbedingungen wurden bereits im Abschnitt 2.4.3 beschrieben. Für die vergleichende Analyse der optimierten Vektoren (Minicircle, MIDGE) mit ihren parentalen Plasmiden wurden alle Vektoren mit Hilfe von Restriktionsenzymen linearisiert. Für den Minicircle und das parentale Plasmid wurde „FastDigest“ EcoRI (Fermentas), für den MIDGE-Vektor und das parentale Plasmid wurden „FastDigest“ KpnI und SacI (Fermentas) verwendet. Dies ist notwendig, da vor allem MIDGE-Vektoren im Vergleich zum äquimolar eingesetzten Plasmid sonst als zu gering quantifiziert werden. Dies konnte auch für Plasmide verschiedener Größen beobachtet werden [215]. Es wurden 250 ng DNA als Template eingesetzt. Die

Vektormenge wurde mit Hilfe von „spiked“ Eichkurven berechnet. Hierzu wurde der jeweilige Vektor in DNA aus Zellen der Zellkultur verdünnt. Die verwendeten Primer und Sonden sind in der Tabelle 9 zusammengefasst. Ihre Synthese erfolgte durch Tib Molbiol.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Temperatur
LacZ DNA fw	AAGCAAAAAAGAAGTCACCATG	62 °C
LacZ DNA rev	GTAAAACGACGGGATCGC	62 °C
LacZ DNA FITC	CGGTCTGGGAGGCATTGGT	---
LacZ DNA LCR640	GGACACCAGCAAGGAGCTGCT	---
Luc fw	GGGCTCACTGAGACTACATC	62 °C
Luc rev	GTAGCCATCCATCCTTGTC	62 °C
TNF α fw	CTCTGGCCCAGGCAGTCAGA	61 °C
TNF α rev	TCGGCAAAGTCGAGATAGTC	61 °C
TNF α FITC	GCATTGGCCCGCGGTTC	---
TNF α LCR640	CCACTGGAGCTGCCCCTCAGCT	---

Tabelle 9: Die für die qPCR verwendeten Oligonukleotide

Die Primer sind unmodifiziert, die Sonden sind mit 3'-FITC bzw. 5'-LCRed640 modifiziert.

2.5.3 DNA Labeling

Um die verschiedenen Gentransfervektoren mikroskopisch zu verfolgen und um die Vektorverteilung auf Zellebene mit Hilfe von FACS zu untersuchen, wurden die Vektoren mit Hilfe des Label IT Nucleic Acid Labeling Kit, Cy3™ (Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben markiert. Es wurden 10 µg DNA mit 5 µl des Label IT Reagenz für 2 h bei 37 °C markiert. Nach jeweils 30 Minuten wurde der Reaktionsansatz kurz abzentrifugiert. Die Isolation nach der Reaktion erfolgte mit Hilfe der Ethanolpräzipitation. Das Volumen wurde auf 200 µl vergrößert und die DNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 5 M NaCl und 2 Volumen abs. Ethanol gefällt. Nach 30 Minuten Inkubation bei -20 °C wurde die DNA pelletiert (14000 rpm, 10 Minuten), gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen. Die markierte DNA wurde anschließend, wie bereits beschrieben, für den *in vitro* Gentransfer eingesetzt (Abschnitt 2.3.1). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss AG) angefertigt.

2.6 Klinische Phase I Gentransferstudie

2.6.1 Patienten

Die klinische Phase I Gentransferstudie (DeReGe 62) wurde an der Robert-Rössle-Klinik, Charité, Berlin durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von der Bundesärztekammer und der zuständigen Ethikkommission geprüft und genehmigt. Für die Gentransferstudie wurden 17 Patienten rekrutiert: 14 Melanom-, 3 Mammakarzinompatienten. Die Einschlusskriterien waren u.a.: Alter ≥ 18 Jahre und ein Karnofsky-Index ≥ 60 (Patient ist in den meisten Bereichen selbstständig) [216]. Daneben mussten erreichbare, resektable, histologisch bestätigte *in transit* Metastasen des malignen Melanoms oder Hautmetastasen des Mammakarzinoms vorliegen. Schwangere und stillende Frauen, Allergiker und Personen mit eingeschränkter Organfunktion (Knochenmark, Niere, Leber) wurden ausgeschlossen. Jeder Patient wurde individuell über Art und Ziel dieser Gentransferstudie aufgeklärt. Die Patienten wurden während der gesamten Studie beobachtet, und es wurden die relevanten klinischen Parameter bestimmt.

2.6.2 Studienprotokoll

Bei jedem Patienten wurde der Gentransfer einmalig nach dem Studienprotokoll mit Hilfe der intratumoralen Jet-Injektion durchgeführt. Es sah 5 Jet-Injektionen á 10 μ l (1 mg Vektor-DNA/ ml) vor, die intratumoral appliziert wurden. Die Gesamtvektordosis pro Patient betrug damit 50 μ g DNA. Nach der Jet-Injektion wurde zu definierten Zeitpunkten (0,5 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 4 Wochen nach Gentransfer) Blut entnommen, um die systemische Vektorverteilung und den Vektorabbau zu untersuchen (Abbildung 6 A). Die behandelten Tumorkläsionen wurden 2-6 Tage nach Jet-Injektion chirurgisch in der Robert-Rössle-Klinik, Charité Berlin entfernt und für nachfolgende histopathologische und molekularbiologische Untersuchungen verwendet (Abbildung 6 B). Neben der histopathologischen Untersuchung (Institut für Pathologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin) des entnommenen Gewebes wurde die systemische und intratumorale Vektorverteilung mit quantitativer PCR untersucht. Außerdem wurde die intratumorale Transgenexpression und -verteilung auf mRNA- und Proteinebene mit qRT-PCR, Western Blot, Immunhistochemie und X-Gal-Färbung untersucht.

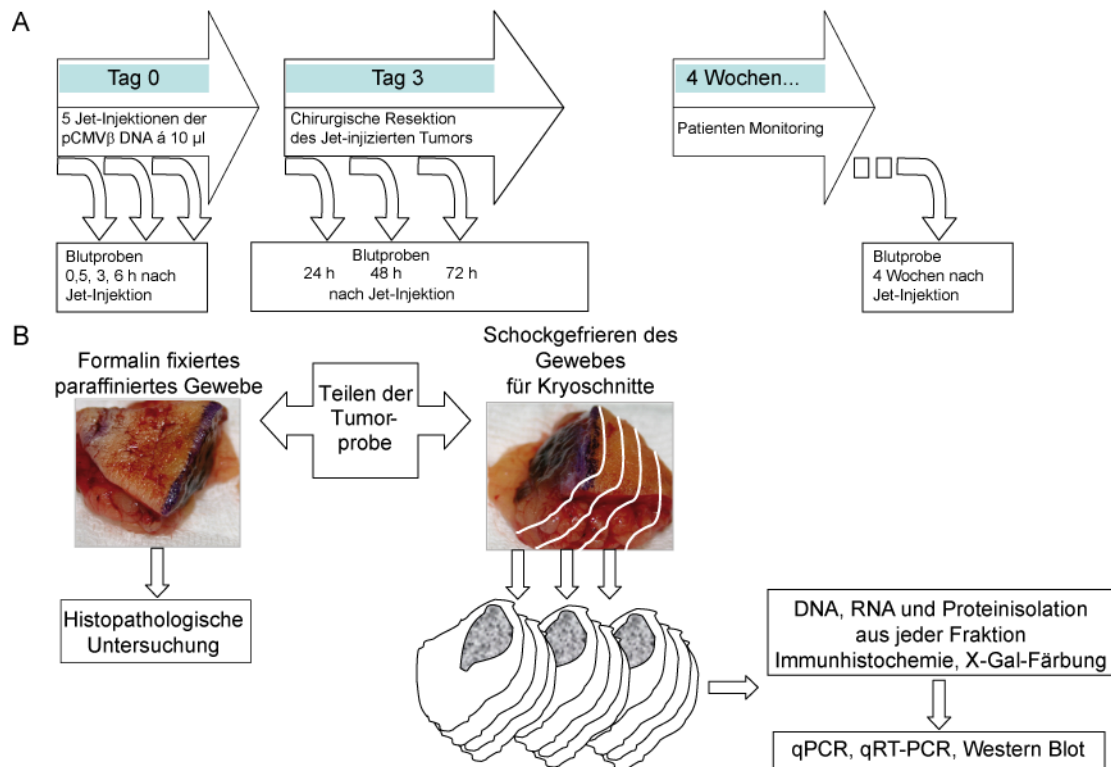


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Studienablaufs (A) und der molekularbiologischen Untersuchungen (B)

Die Abbildung fasst das Studiendesign (A) zusammen. Das resizierte Tumorgewebe wurde geteilt und histopathologisch und molekularbiologisch aufgearbeitet (B). nach [113]

2.6.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Tumorsektate wurden direkt nach der Entnahme geteilt. Die Teilung erfolgte radial durch die Injektionsstelle. Eine Hälfte wurde für die histopathologische Evaluation in Formalin fixiert und später in Parafin eingebettet, die andere Hälfte für die molekularbiologische Untersuchung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die Isolation von DNA, RNA und Proteinen wurden die Resektate in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen am Rhein, Niederlande) eingebettet und im Kryomikrotom seriell geschnitten. Die daraus entstandenen Fraktionen konnten kurzzeitig in Trizol bei -80 °C gelagert werden oder wurden direkt weiter verwendet (siehe 2.4.1, 2.4.7, 2.5.1.1). Je 10 Schnitte wurden für die Isolation von DNA, RNA und Proteinen verwendet. Nach diesen 10 Schnitten wurden Proben für die X-Gal-Färbung und den immunhistochemischen β-Galactosidasenachweis auf Objektträgern gesammelt (siehe 2.4.10, 2.4.11).

Die Blutproben der Patienten wurden direkt nach der Entnahme in der Klinik abgeholt und ohne weitere Lagerung für die Vektor-Isolation verwendet (Abschnitt 2.5.1.2).

2.7 Mausmodelle

Die Tierexperimente wurden in Zusammenarbeit mit der EPO-GmbH (Experimental Pharmacology & Oncology Berlin-Buch GmbH, Berlin, Deutschland) nach den geltenden rechtlichen und ethischen Bestimmungen durchgeführt. Die Tiere wurden in Gruppen mit maximal sechs Individuen gehalten. Futter und Wasser standen *ad libidum* zur Verfügung.

2.7.1 Tumormodell

Für die Etablierung von Xenotransplantat-Tumoren der humanen Melanomzelllinie A375, wurden 1×10^7 Zellen in 100 μ l PBS s.c. in die Flanken von 4-6 Wochen alten NMRI nu/nu Mäusen injiziert. Es wurden ausschließlich Zellen in niedrigen Passagen und mit hoher Vitalität verwendet. Nach 4 Wochen haben sich subkutane Tumore mit einem Volumen von ca. 1 cm³ für die intratumorale Jet-Injektion entwickelt.

2.7.2 Intratumorale Jet-Injektion

Die Jet-Injektion wurde unter Narkose durchgeführt. Die Narkose erfolgte mit Hilfe einer i.p. Injektion von 400 μ l Hypnomidate (2 mg/ml Etomidate, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland). Nach 10-15 Minuten wurde die intratumorale Jet-Injektion mit dem Swiss-Injektor (EMS) ausgeführt. Jedes Tier erhielt insgesamt 5 Jet-Injektionen á 10 μ l an 5 verschiedenen Tumorpositionen. Zu definierten Zeitpunkten wurden Blutproben als EDTA-Blut gesammelt. Während des gesamten Experiments wurden die Tiere beobachtet und Parameter wie Körpertemperatur und Körpergewicht gemessen. Tumor- und Organproben wurden ebenfalls zu definierten Zeitpunkten gesammelt. Nach zervikaler Dislokation wurden die Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Um aus den Geweben die verschiedenen Proben (DNA, RNA, Protein) zu isolieren, wurden die Gewebe in Tissue-Tek O.C.T. Compound eingebettet und im Kryomikrotom seriell geschnitten. Die entstandenen Fraktionen wurden anschließend direkt für die Proben-Isolation verwendet.

2.7.3 *In vivo* Imaging

Für das *in vivo* Imaging wurde Luziferase (Glühwürmchen, *P. pyralis*) als Reportergen verwendet. Die jeweiligen Vektoren wurden äquimolar mit Hilfe der Jet-Injektion intratumoral in narkotisierten Tieren appliziert. Um die Luziferaseaktivität *in vivo* zu zeigen wurde den Tieren zu definierten Zeitpunkten nach Gentransfer unter Narkose das Substrat Luziferin (Biosynth AG, Staad, Schweiz) 200 mg pro kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 20 Minuten Inkubation auf einer Wärmematte wurde die Lichtemission in einem *in vivo* Imager (NightOwl LB981 NC100E, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen. Die Signalentwicklung wurde über 5 Minuten integriert und mit Hilfe der Software WinLight32 (Version 2.80N) analysiert.

2.8 Präklinische toxikologische Untersuchung des MIDGE-Vektors

Die präklinische Untersuchung des MIDGE-Vektors als Voraussetzung für folgende klinische Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den „Good Laboratory Practice“ (GLP) Regularien bei LABORATORY of PHARMACOLOGY and TOXICOLOGY (LPT, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Der Vektor wurde unter GLP-Bedingungen von Mologen hergestellt. Die Applikation des Vektors erfolgte unter Kurzzeitrnarkose (Ketamin/ Xylazin, i.p. Injektion) in die Flanke von NMRI nu/nu Mäusen. Als Applikationssystem wurde der Swiss-Injector (EMS Medical) verwendet. Es wurden 5 Injektionen á 10 µl s.c. appliziert. Dies ergab eine Gesamtektordosis von 150 µg MIDGE-Vektor (technisches Limit 3 mg DNA pro ml) und 50 µg MIDGE-Vektor (optimale Vektorkonzentration 1 mg DNA pro ml). Der Kontrollgruppe wurde PBS (5 Injektionen á 10 µl) appliziert. Während der folgend 24 h wurden die Tiere intensiv beobachtet, um Verhaltensauffälligkeiten und Unverträglichkeitsreaktionen, die durch die Vektorapplikation auftreten, sofort zu erkennen. Diese Beobachtungen wurden für 14 Tage fortgesetzt. Alle Tiere wurden mindestens einmal täglich begutachtet. Dabei wurden Parameter wie Augen- Haut-, Fell- und Schleimhautveränderungen, Atmung, Anatomie, Funktion des zentralen Nervensystems, Körpergewicht und allgemeine Aktivität untersucht. Am Ende des Testzeitraums von 14 Tagen wurden die Tiere getötet und Blut- und Organproben (Leber, Niere, Lunge, Milz) gesammelt. Die Tiere wurden pathologisch untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Gentransfer-Studie

3.1.1 Patienten

Das Konzept der lokalen nicht-viralen Gentherapie mittels Jet-Injektion nackter Plasmid-DNA wurde in einer klinischen Phase I Studie bezüglich Anwendbarkeit, Sicherheit und Effektivität geprüft. Im Rahmen dieser klinischen Phase I Gentransferstudie (DeReGe 62) wurden 17 Patienten mit Metastasen des Mammakarzinoms oder Melanoms behandelt (Tabelle 10). Es wurde je Patient jeweils eine Läsion für die gentherapeutische Behandlung ausgewählt (Tabelle 11). Es wurden 5 Jet-Injektionen mit jeweils 10 µl Volumen (1 mg Vektor-DNA/ ml) appliziert. Exemplarisch zeigt Abbildung 7 je eine Läsion einer Mammakarzinompatientin und eines Melanompatienten kurz nach Jet-Injektion (Abbildung 7 A) und 24 h nach Jet-Injektion (Abbildung 7 B). Die Jet-Injektion wurde von 16 der 17 Patienten gut toleriert. Bei einem Patienten musste die Behandlung aufgrund auftretender Schmerzen nach drei Injektionen beendet werden. Von kleinen Blutungen abgesehen gab es keine Nebenwirkungen der Applikation. Die Vitalzeichen wie Atmung, Herzschlag, Blutdruck und Körpertemperatur und die klinischen Laborwerte änderten sich nach der Jet-Injektion nicht.

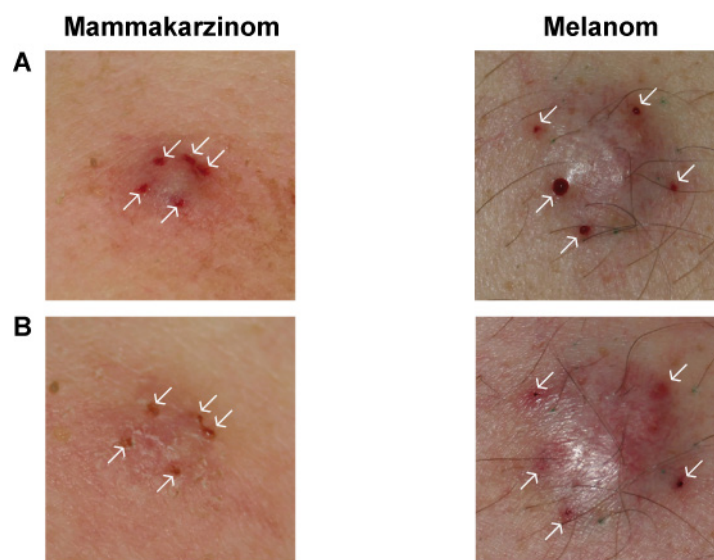


Abbildung 7: Jet-Applikation in Patiententumore

Patiententumore eines Mammakarzinom- und Melanompatienten unmittelbar nach (A) und 24 h nach (B) Jet-Injektion. Die Pfeile weisen auf die Injektionsstellen. Die Applikationsläsionen schließen sich innerhalb von 24 Stunden. nach [113]

Patienten Nr.	Alter, Genus	Tumor-entität	UICC-Stadium	Lokalisierung der behandelten Läsion	Zeit bis zur Resektion [d]/ Follow-up [Mon]
1	82, W	Brust	IV	Thorax, L	3/ 18,4
2	67, W	Melanom	IV	Femur, L	3/ 15,2
3	46, M	Melanom	IIIc	Inguinal, L	3/ 14,7
4	49, W	Brust	IV	Thorax, R	5/ 14,7
5	61, M	Melanom	IIIc	Femur, L	4/ 14,4
6	53, M	Melanom	IIIc	Femur, R	6/ 13,9
7	57, M	Melanom	IIIb	Inguinal, L	3/ 11,5
8	70, W	Brust	IV	Thorax, L	2/ 11,2
9	85, W	Melanom	IIIb	Crus, R	4/ 9,1
10	73, M	Melanom	IIIc	Femur, L	4/ 8,9
11	57, M	Melanom	IIIc	Femur, L	4/ 8,3
12	75, W	Melanom	IIIc	Femur, L	3/ 8,1
13	83, W	Melanom	IIIc	Femur, R	4/ 6,8
14	66, M	Melanom	IIIc	Inguinal, R	3/ 6,6
15	50, M	Melanom	IIIc	Inguinal, L	5/ 5,0
16	71, M	Melanom	IIIc	Inguinal, R	2/ 4,4
17	82, W	Melanom	IIIb	Femur, R	3/ 4,2

Tabelle 10: Patientencharakteristika

Abkürzungen: W weiblich, M männlich; L links, R rechts; d Tage, Mon Monate; nach [113]

Die Tumoren wurden 2-6 Tage nach Jet-Injektion gemäß den Protokollkriterien entfernt. Während der 4-wöchigen Beobachtungszeit zeigte kein Patient negative Symptome nach der Jet-Injektion. Nach Ablauf der vier Wochen waren alle Patienten unauffällig und auch in der anschließenden Beobachtungszeit nach Studienende zeigten sich keine negativen Nebeneffekte der gentherapeutischen Behandlung. Die patientenrelevanten Daten sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Der Karnofski-Index lag bei allen Patienten bei ≥ 80 .

3.1.2 Plasmid-DNA Verteilung in den Tumoren

Im Rahmen der Gentransfer-Studie wurden die Bioverteilung und der Abbau der applizierten 50 µg Plasmid-DNA quantitativ analysiert. Die applizierte Vektor-DNA konnte in allen behandelten Tumorkläsionen nachgewiesen werden. Ihre Menge schwankte individuell stark zwischen den verschiedenen Tumoren sowie auch innerhalb der jeweiligen Tumoren. Diese Unterschiede waren allerdings nicht von Tumorentität oder Tumorgröße abhängig (Tabelle 11).

Patienten Nr.	Maximum Plasmid DNA [pg/250 ng Tumor DNA]	Relative LacZ-mRNA Expression (% Kalibrator)	LacZ-Protein Nachweis (Immunhistochemie)	Funktionsnachweis LacZ (X-Gal-Assay)	Probengröße [mm]
1	132,8	7,8	+	+	46x 5x 5
2	21066,1	863,0	+	+	18x 5x 9
3	<0,001	0,6	+	+	54x 5x25
4	8,9	6,4	+	+	8x 6x 5
5	1676,9	723,5	+	+	30x10x 3
6	0,12	0,3	+	+	20x10x10
7	0,32	112,6	+	+	20x10x 8
8	0,17	<0,1	+	+	36x15x15
9	135,2	0,6	+	+	44x12x 6
10	3,1	3,8	+	+	12x 5x 4
11	1,5	1,8	+	+	14x 5x 5
12	1,9	<0,1	+	+	22x10x10
13	0,6	<0,1	+	+	34x15x 7
14	0,6	<0,1	+	+	8x 9x 4
15	<0,001	<0,1	+	+	16x 8x 5
16	175,8	<0,1	+	+	12x 5x 5
17	2,4	<0,1	+	+	30x10x10

Tabelle 11: Vektornachweis und LacZ-Expression in Tumoren; nach [113]

Um die detaillierte Vektorverteilung innerhalb der jeweiligen Tumore zu untersuchen, wurden die Läsionen seriell geschnitten (10 Schnitte á 20 µm pro Fraktion) und die entstandenen Fraktionen mit Hilfe von quantitativer PCR untersucht. In Abbildung 8 werden repräsentativ die Analysen für die zwei Tumorentitäten (Mammakarzinom, Patient 1 und Melanom, Patient 2, Tabelle 10) gezeigt. Es konnte für alle Tumore die Anwesenheit der Vektoren gezeigt werden (Abbildung 8 A). Die nachgewiesene Vektormenge variierte stark zwischen den untersuchten Tumoren (Tabelle 11). Es wurden Areale mit sehr hohen Vektormengen gefunden, sowie in direkter Nachbarschaft dazu Areale mit geringerem Vektorgehalt. Dies galt sowohl für die untersuchten Mammakarzinome (Abbildung 8 B), als auch für die Melanome (Abbildung 8 C). Die gefundenen Vektormengen reichten von einigen ng Plasmid-DNA pro 250 ng Gewebe DNA bis zu wenigen fg Plasmid-DNA pro 250 ng Gewebe DNA (Tabelle 11). Weiterhin schwankten auch die maximalen Vektormengen, die in einer Tumorfraction einer individuellen Läsion nachgewiesen wurden (Tabelle 11). Der Nachweis der Vektor-DNA wurde zusätzlich zur qPCR mit Hilfe von Agarosegelen qualitativ verifiziert.

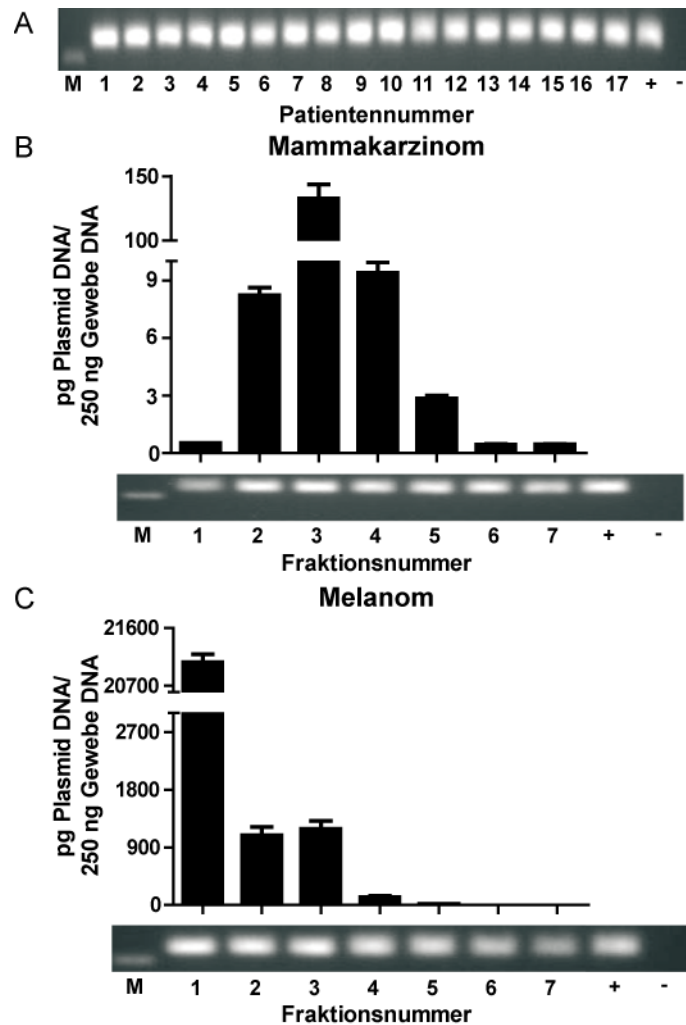


Abbildung 8: Plasmid-DNA Verteilung in den jet-injizierten Tumoren

Die Abbildung zeigt den Vektornachweis in allen 17 Patiententumoren. Die PCR-Produkte der Fraktionen mit der höchsten Vektormenge wurden mit Hilfe von Agarosegelen qualitativ nach der qPCR analysiert (A). Die Vektorverteilung innerhalb je eines fraktionierten Tumors der zwei untersuchten Tumorentitäten (Mammakarzinom, B; Melanom, C) zeigt eine diskontinuierliche Verteilung der Vektoren im Gewebe. Nach der qPCR wurden die PCR-Produkte wiederum mit Hilfe von Agarosegelen visualisiert. Abkürzungen: M Marker 100 bp, + Positiv-Kontrolle, - Negativkontrolle; Mittelwert (Duplikat) \pm S.D. nach [113]

3.1.3 LacZ-Nachweis auf mRNA und Proteinebene

Neben dem Nachweis der Vektor-DNA konnte in allen 17 behandelten Tumoren die Expression des LacZ-Transgens quantitativ auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Die Amplikons der Fraktionen mit der höchsten mRNA-Expression aller Patienten wurden wiederum mit Hilfe von Agarosegelen qualitativ analysiert (Abbildung 9 A). Die Abbildungen 9 B und 9 C zeigen die Ergebnisse der qRT-PCR repräsentativ für die Patienten 1 (Mammakarzinom) und 2 (Melanom) in den seriell geschnittenen Tumoren. Die mRNA-Menge variierte auch hier stark zwischen den verschiedenen Tumoren, wie auch innerhalb eines Tumors (Tabelle 11, Abbildung 9 B, 9 C). Die Analysen zeigten eine positive Korrelation zwischen Vektor-DNA Menge und Expressionsniveau: Die Fraktionen mit einer hohen Vektormenge zeigten dabei auch eine hohe Transgenexpression (Tabelle 11, Abbildungen 8 B, 8 C; 9 B, 9 C). Die Fraktionen in direkter Nachbarschaft zeigten mit sinkender Vektormenge auch eine geringere mRNA-Expression. Darüber hinaus konnte mit Hilfe von Agarosegelen nach der qRT-PCR das richtige Produkt in allen analysierten Fraktionen verifiziert werden (Abbildung 9 B, 9 C). Zusätzlich wurde die Translation des LacZ-Proteins mit Hilfe von Western Blots in Fraktionen mit hoher Transgen-Transkription (Fraktionen 1-4) qualitativ gezeigt (Abbildung 9 B, 9 C).

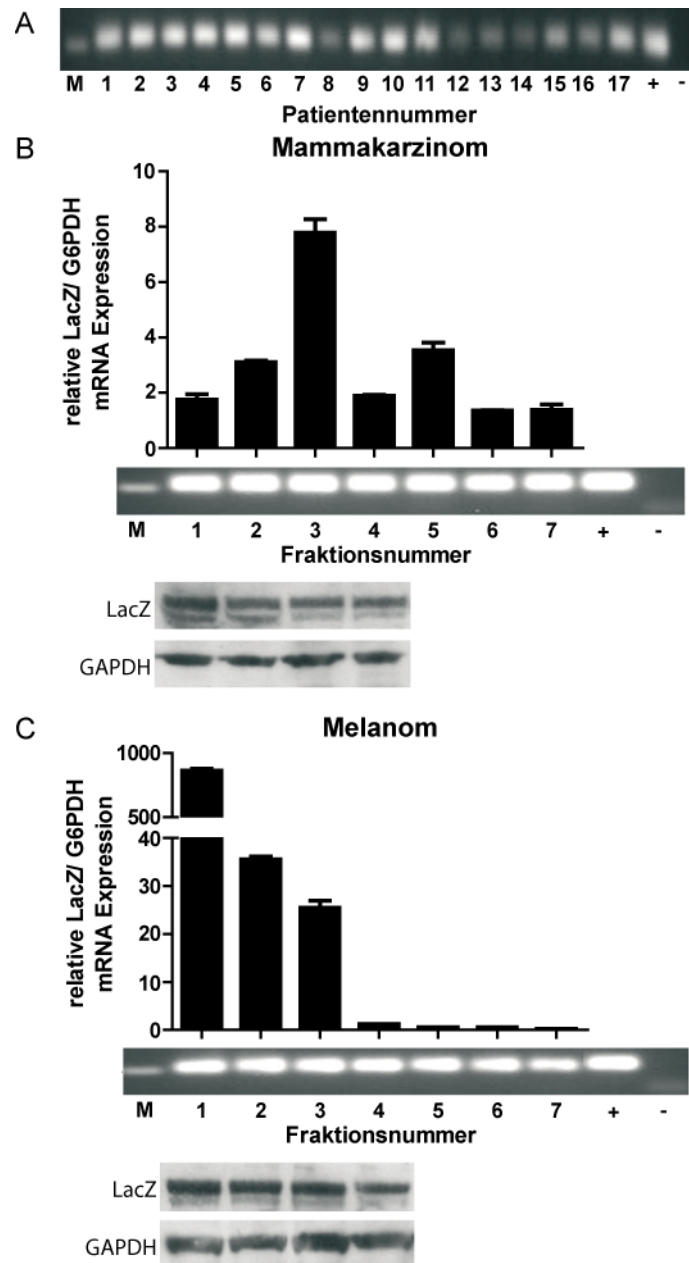


Abbildung 9: LacZ-Nachweis auf mRNA- und Proteinebene

Die Abbildung fasst den LacZ-Expressionsnachweis in den 17 untersuchten Tumoren zusammen. Es wurden wiederum die PCR-Produkte der Fraktionen mit der höchsten LacZ-Expression nach qRT-PCR fraktionierter Tumore mit Hilfe von Agarosegelen qualitativ analysiert (A). Die mRNA-Verteilung innerhalb je eines fraktionierten Tumors der zwei untersuchten Tumorentitäten (Mammakarzinom, B; Melanom C) zeigte eine deutlich diskontinuierliche Verteilung der Transgenexpression im Gewebe. Nach der qRT-PCR wurden die PCR-Produkte wiederum mit Hilfe von Agarosegelen visualisiert. Es wurden die gleichen Fraktionen wie in Abbildung 8 verwendet. Von Fraktionen mit hoher Genexpression (1-4) wurde die LacZ-Proteinexpression zusätzlich im Western Blot gezeigt. GAPDH diente als Ladekontrolle. Abkürzungen: M Marker 100 bp, + Positivkontrolle, - Negativkontrolle; Mittelwert (Duplikat) \pm S.D. nach [113]

3.1.4 Funktionaler LacZ-Nachweis und LacZ-Verteilung im Tumorgewebe

Für eine erfolgreiche Gentherapie ist nicht nur die Höhe der Transgenexpression von Interesse, sondern auch dessen Verteilung im Gewebe. Um die Verteilung der Transgen-positiven Zellen zu untersuchen, wurde in Tumorschnitten LacZ mit Hilfe von Immunhistochemie analysiert (Abbildung 10 A). Um die Funktion des Transgens innerhalb des Tumors zu untersuchen, wurden die Tumorfractionen mit Hilfe des X-Gal-Assays untersucht (Abbildung 10 B). Dabei konnte in allen Tumoren eine funktionale, lokal begrenzte Transgenexpression nachgewiesen werden. LacZ wurde im Zytoplasma nachgewiesen. Die Stärke und Verteilung der LacZ-positiven Areale variierte wiederum stark zwischen und innerhalb der Tumore. Die LacZ-positiven Areale zeigten sich als Spots innerhalb des Tumorgewebes (Abbildung 10), was die Ergebnisse der qPCR und qRT-PCR unterstützt (Abbildung 8 B, 9 B).

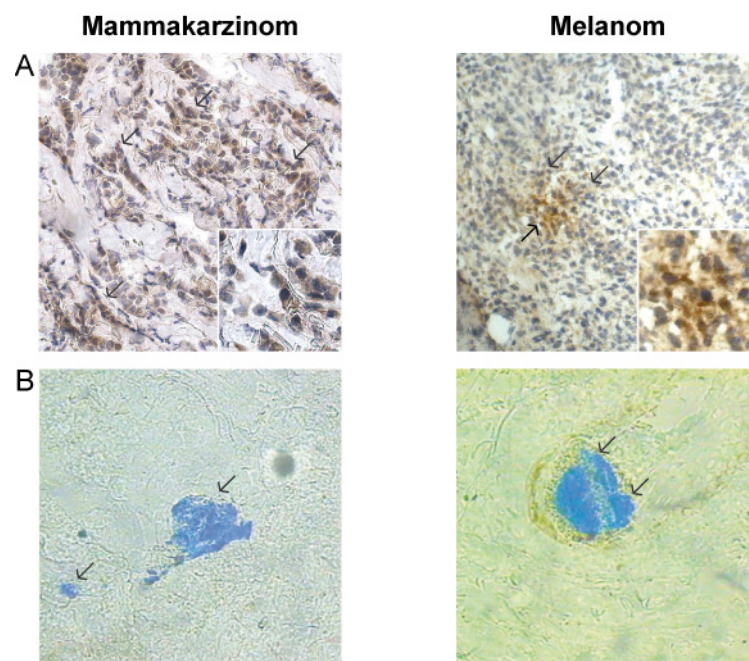


Abbildung 10: LacZ-Nachweis im jet-injizierten Tumorgewebe

Es konnte mit dem immunhistochemischen LacZ-Nachweis (positive Areale braun gefärbt) wiederum eine starke räumliche Begrenzung der Transgenexpression (A) gezeigt werden. Die Inserts zeigen die zytoplasmatische Verteilung des LacZ-Proteins. Die Funktionalität des exprimierten LacZ-Proteins wurde mit Hilfe des β -Gal-Assays (positive Areale blau gefärbt) nachgewiesen (B). Auch hier konnte die eng begrenzte Lokalisation des Transgens bestätigt werden. nach [113]

3.1.5 Systemischer Vektorabbau im Blut

Die systemische Verteilung und vor allem der Vektorabbau sind wichtige Parameter für die klinische Sicherheit der Jet-Injektion als Gentransfertechnologie. Über die Vaskularisierung des Tumorgewebes kann Vektor-DNA in die Blutbahn gelangen und potentiell systemisch verteilt werden. Die quantitative Analyse der Plasmid-DNA im Blut wurde zu definierten Zeiten in allen Patienten durchgeführt. In 14 der 17 Patienten (>80%) konnte eine identische Kinetik des Vektorabbaus nachgewiesen werden (Tabelle 12). Es war ein Maximum der Vektormenge 30 Minuten nach Jet-Injektion nachweisbar. Die nachgewiesene Vektormenge lag jedoch nur im fg-Bereich pro 250 ng Blut-DNA (Tabelle 12). Diese Vektormenge wurde innerhalb weniger Stunden nahezu vollständig abgebaut. Vier Wochen nach Jet-Injektion war bei keinem der behandelten Patienten Vektor-DNA im Blut nachweisbar (Tabelle 12). In drei Patienten wurde die höchste Vektormenge im Blut nach drei bzw. 6 Stunden nach Jet-Injektion nachgewiesen (Tabelle 12). In Abbildung 11 ist der Vektorabbau über die Zeit exemplarisch für die Patienten 1 und 2 gezeigt. Die Mittelwerte des DNA-Abbaus aller 17 Patienten bestätigen die generelle systemische Abbau-Kinetik in der Studie (Abbildung 12).

Patienten Nr.	Maximum Plasmid DNA [fg/ 250 ng Blut DNA]	Zeitpunkt der maximalen Vektormenge im Blut [h]	Zeit bis zum vollständigen Abbau [h]
1	169,2	0,5	>72
2	394,4	0,5	24
3	253,0	0,5	24
4	119,7	0,5	72
5	100,1	0,5	24
6	96,6	0,5	72
7	27,3	3	72
8	162,8	3	>72
9	41,8	0,5	3
10	1,2	0,5	3
11	1,7	0,5	3
12	13,0	0,5	6
13	886,1	0,5	48
14	87,1	0,5	>72
15	8,2	6	24
16	8485,0	0,5	24
17	251,3	0,5	6

Tabelle 12: Vektornachweis und -Abbau im Blut; nach [113]

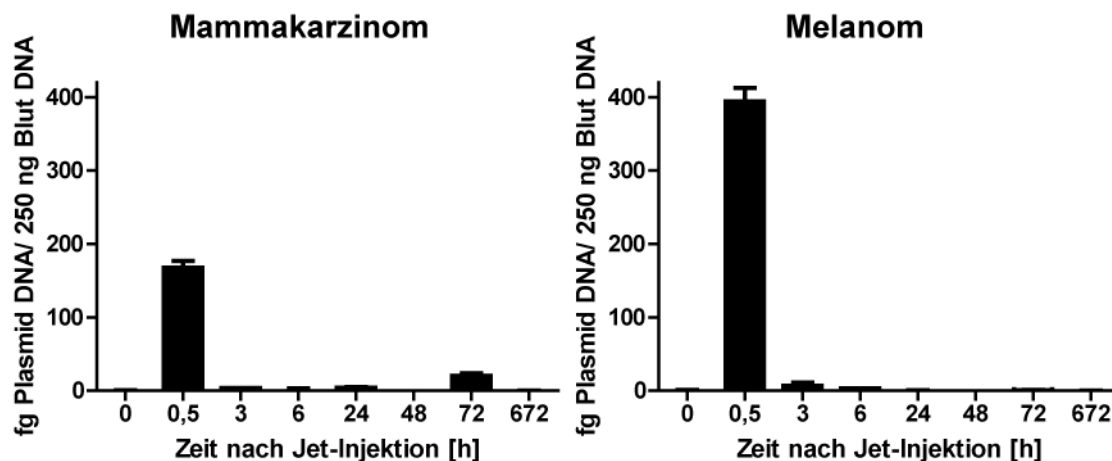


Abbildung 11: Vektorabbau im Blut der Patienten 1 und 2

Die Vektorabbau wurde im Blut der Patienten mittels qPCR untersucht. Die Einzelanalysen der Patienten 1 und 2 zeigten eine ähnliche Abbau-Kinetik. Die größte Vektormenge konnte kurz nach der Jet-Injektion nachgewiesen werden. Der vollständige Abbau der DNA erfolgte innerhalb weniger Stunden nach Jet-Injektion. Mittelwert (Duplikat) \pm S.D. nach [113]

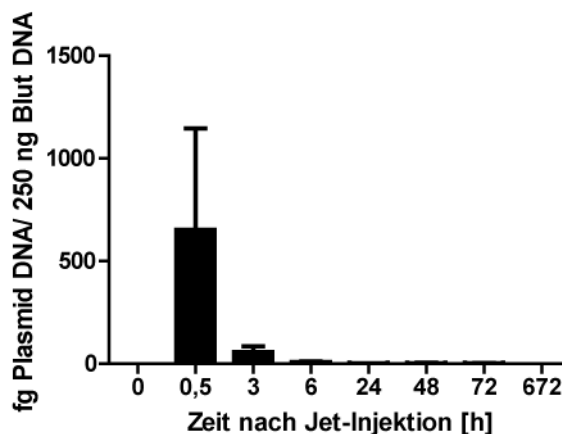


Abbildung 12: Vektorabbau in allen Patienten

Die mit Hilfe der qPCR nachgewiesenen DNA-Mengen der 17 Patienten zeigen eine vergleichbare Abbau-Kinetik in den Patienten. Nach einem Maximum der Vektormenge im Blut 30 Minuten nach Jet-Injektion wurde die Vektor-DNA innerhalb weniger Stunden aus dem Blut entfernt. Darstellung: Mittelwert \pm S.E. n=17 pro Zeitpunkt

3.1.6 Zusammenfassung Klinische Gentransfer-Studie

Im Ergebnis zeigt diese klinische Gentransfer-Studie, dass die Jet-Injektion mit Hilfe des Swiss-Injectors sicher und effektiv für die humane Gentherapie eingesetzt werden kann. Der Gentransfer mit Hilfe nackter Plasmid-DNA ist daher prinzipiell möglich, aber neuartige nicht-virale Vektoren könnten die Sicherheit und vor allem die Effizienz der Gentherapie erhöhen. Daher wurde im Ergebnis der Studie der Schwerpunkt auf die Etablierung neuer, minimalistischer Vektoren im Rahmen dieser Arbeit gelegt. Die folgenden Kapitel widmen sich der Optimierung des Vektorsystems, um die Sicherheit, die Gentransfer- sowie die Expressionseffizienz zu verbessern, und so die weitere klinische Anwendung für die Tumorgentherapie zu realisieren.

3.2 Vergleichende Expressionsanalysen neuer minimalistischer Vektoren

Um die Gentransfer- und Expressionseffizienz sowie die Sicherheit der nicht-viralen Gentherapie zu erhöhen, wurden verschiedene minimalistische Vektoren miteinander und mit ihren parentalen Plasmiden verglichen. Diese Vektoren waren die Minicircle-Konstrukte (Kapitel 1.3.1) und die MIDGE-Vektoren (Kapitel 1.3.2). Sie sind doppelsträngige, DNA-basierte, minimalistische Vektoren, deren Größe im Vergleich zu den Ausgangsplasmiden deutlich reduziert ist. Ziel bei ihrer Entwicklung war es, die Sequenzen außerhalb der Expressionskassette zu reduzieren, da sie für die Genexpression nicht benötigt werden bzw. diese negativ beeinflussen können.

Um die Expression der neuartigen minimalistischen Vektoren *in vitro* zu untersuchen, wurden vier humane Melanom- und zwei humane Kolonkarzinomzelllinien transfiziert oder elektroporiert. Es wurden für alle Zelllinien identische Gentransferbedingungen gewählt (Kapitel 2.3.1), da ausschließlich der Einfluss der verschiedenen Vektoren auf das Expressionsniveau untersucht werden sollte. Für die Zelllinie A375 (Abbildung 13), aber auch für die weiteren fünf untersuchten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach äquimolarem Gentransfer der minimalistischen Vektoren ein erhöhtes Luziferasesignal produzieren (Transfektion Tabelle 13, Elektroporation Tabelle 14).

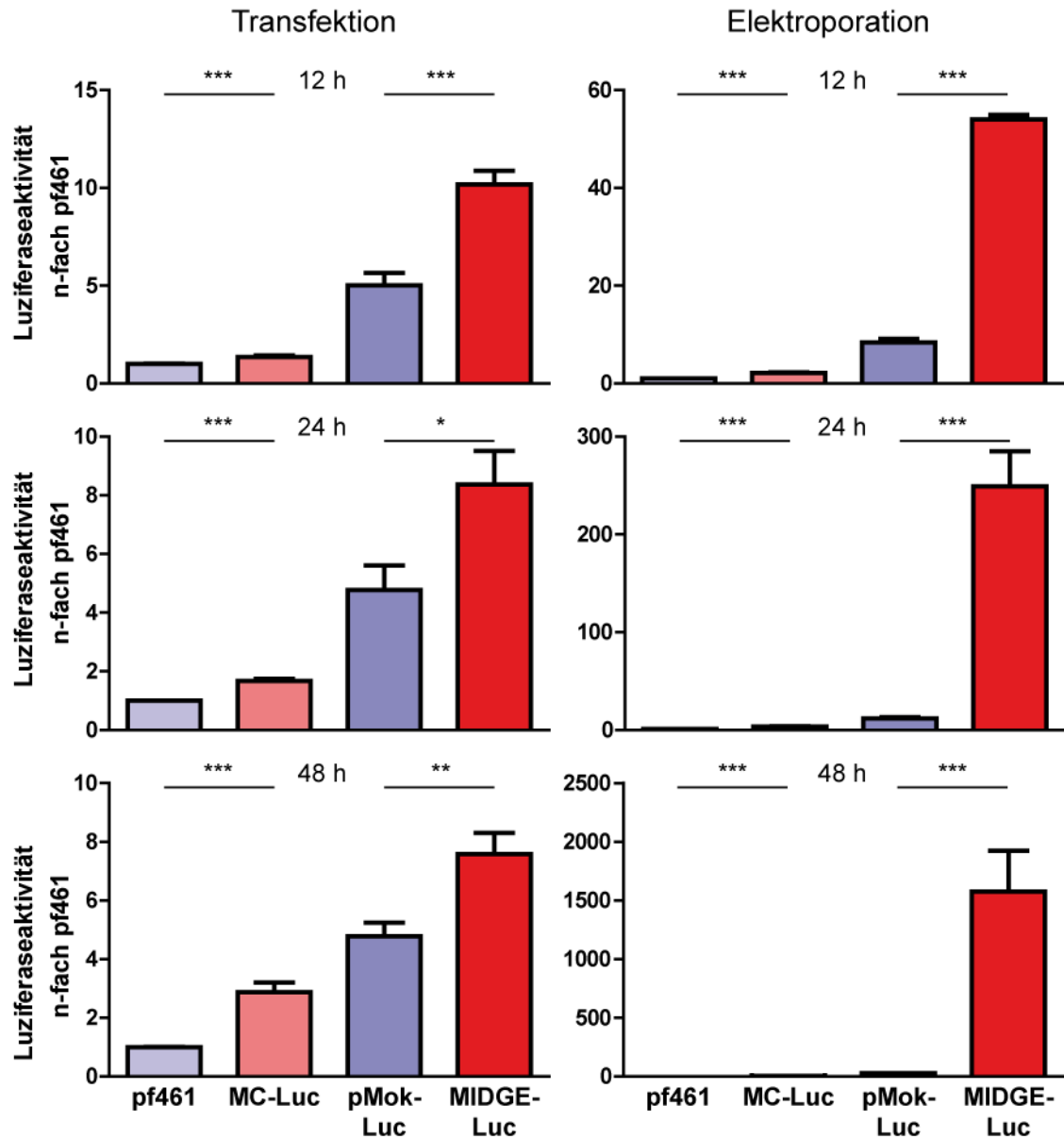


Abbildung 13: *In vitro* Gentransfer minimalistischer Vektoren in A375 Zellen
Exemplarisch wird für die Zelllinie A375 die n-fache Veränderung des Luziferasesignals nach äquimolarem Gentransfer (Transfektion und Elektroporation) jeweils nach 12, 24 und 48 h relativ zum Plasmid pf461 dargestellt. Die minimalistischen Vektoren Minicircle und MIDGE zeigten zu jedem Zeitpunkt mit beiden Transfertechniken ein höheres Expressionsniveau als ihre parental Plasmide.

	MC-Luc n-fach pf461	12 h pMok-Luc n-fach pf461	MIDGE-Luc n-fach pf461
A375	1,35±0,08	5,02±0,60	10,18±0,66
MeWo	1,55±0,09	1,58±0,17	4,35±0,51
SKMEL-5	3,26±0,34	5,07±0,44	12,37±2,05
SK-MEL-28	2,35±0,27	5,93±1,06	11,87±2,10
HCT 116	1,71±0,17	2,42±0,20	8,37±1,10
SW480	1,81±0,17	3,65±0,62	6,13±0,53

	MC-Luc n-fach pf461	24 h pMok-Luc n-fach pf461	MIDGE-Luc n-fach pf461
A375	1,68±0,07	4,78±0,83	8,37±1,14
MeWo	1,41±0,08	1,21±0,17	4,45±0,44
SKMEL-5	2,06±0,16	3,36±0,24	4,96±0,29
SK-MEL-28	2,31±0,24	2,52±0,48	6,68±1,05
HCT 116	1,44±0,10	1,95±0,13	6,56±0,47
SW480	1,75±0,12	6,43±0,77	10,20±1,62

	MC-Luc n-fach pf461	48 h pMok-Luc n-fach pf461	MIDGE-Luc n-fach pf461
A375	2,88±0,32	4,78±0,47	7,58±0,72
MeWo	1,33±0,06	1,06±0,24	2,87±0,18
SKMEL-5	1,51±0,06	2,20±0,13	2,90±0,16
SK-MEL-28	1,81±0,22	1,51±0,22	4,58±0,16
HCT 116	1,38±0,05	1,62±0,05	4,07±0,20
SW480	1,23±0,10	5,08±0,40	8,85±1,21

Tabelle 13: Vergleich der Expressionseffizienzen Plasmid- vs. minimalistischer Vektor-vermittelter Luziferaseexpression nach Transfektion
Die Faktoren wurden relativ zum größten verwendeten Plasmid (pf461) angegeben. Das Luziferasesignal nach pf461-Gentransfer wurde zu jedem Zeitpunkt eins gesetzt.

Nach äquimolarer Transfektion konnte mit Hilfe der Minicircle-Vektoren im Vergleich zu pf461 eine gesteigerte Luziferaseaktivität in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Diese Steigerung lag im Bereich von bis zu 3-fach. In keinem Fall lag die Luziferaseexpression unter der der Plasmid-vermittelten (pf461) Expression. Da das Plasmid pMok-Luc bereits kleiner als pf461 ist (6,2kB vs. 4.4kB) ist, war bereits bei Verwendung dieses Vektors die Transgenexpression erhöht. Dieser erhöhte Expressionslevel konnte durch Verwendung des MIDGE-Vektors weiter um bis zu 3-fach gesteigert werden. Wiederum war die Luziferaseexpression in keinem Fall bei Verwendung des minimalistischen Vektors kleiner als bei Applikation des parentalen Plasmids. Ein vergleichbares Bild zeigte sich bei Verwendung der Elektroporation als Transfermethode. Die Luziferaseexpression nach Transfer des Minicircle-Vektors war

um bis zu 5-fach im Vergleich zu pf461 erhöht und in keinem Fall kleiner als bei Verwendung des parentalen Plasmids. Auch der MIDGE-Vektor zeigte eine erhöhte Transgenexpression im Vergleich zum parentalen Plasmid pMok-Luc. Vor allem bei Verwendung der Zelllinie A375 konnte eine starke Zunahme bis zu 50-fach der Luziferaseexpression nachgewiesen werden.

Die Luziferaseexpression lag nach Transfektion zum Teil wesentlich über denen nach Elektroporation, vor allem bei Verwendung der zirkulären Vektoren. Erst bei Verwendung des MIDGE-Vektors für den Gentransfer mit Hilfe der Elektroporation konnte ein Expressionsniveau vergleichbar dem der Transfektion erreicht werden.

	MC-Luc n-fach pf461	12 h pMok-Luc n-fach pf461	MIDGE-Luc n-fach pf461
A375	2,19±0,07	8,44±0,71	54,02±0,90
MeWo	1,68±0,25	27,10±7,82	35,46±9,75
SKMEL-5	1,14±0,02	2,90±0,13	7,26±0,05
SK-MEL-28	2,63±0,37	9,23±1,97	26,43±0,84
HCT 116	1,08±0,06	9,07±1,34	8,09±0,80
SW480	2,88±0,73	13,04±2,09	23,90±3,07

	MC-Luc n-fach pf461	24 h pMok-Luc n-fach pf461	MIDGE-Luc n-fach pf461
A375	3,72±0,19	11,89±1,21	249,42±35,79
MeWo	1,51±0,34	13,25±3,21	32,33±7,54
SKMEL-5	1,32±0,02	3,52±0,11	11,04±0,26
SK-MEL-28	2,37±0,39	11,51±3,15	35,85±2,54
HCT 116	1,87±0,24	9,11±2,42	20,95±2,34
SW480	1,60±0,28	7,00±0,61	35,00±7,11

	MC-Luc n-fach pf461	48 h pMok-Luc n-fach pf461	MIDGE-Luc n-fach pf461
A375	4,15±0,38	27,21±1,63	1574,19±349,11
MeWo	5,08±1,46	41,96±15,35	227,35±89,58
SKMEL-5	1,71±0,04	3,01±0,04	11,34±0,44
SK-MEL-28	1,94±0,25	10,30±3,41	44,62±4,82
HCT 116	2,00±0,38	6,26±1,26	26,38±10,36
SW480	2,81±0,21	7,96±0,63	54,01±8,70

Tabelle 14: Vergleich der Expressionseffizienzen Plasmid- vs. minimalistischer Vektor-vermittelter Luziferaseexpression nach Elektroporation
Die Faktoren wurden relativ zum größten verwendeten Plasmid (pf461) angegeben. Das Luziferasesignal nach pf461-Gentransfer wurde zu jedem Zeitpunkt eins gesetzt.

3.2.1 Zusammenfassung Vergleichende Expressionsanalysen der minimalistischen Vektoren

Es konnte in den Expressionsanalysen gezeigt werden, dass die Vektorgröße die Expressionseffizienz (Expressionslevel) sowohl bei Transfektion als auch Elektroporation deutlich beeinflusst. Bei Verwendung der neuartigen minimalistischen Vektoren Minicircle und MIDGE konnten erhöhte Luziferasesignale im Vergleich zu den jeweiligen parental Plasmiden gemessen werden. Dies gilt für alle untersuchten Zelllinien. Diese Erhöhung der Luziferaseexpression blieb über die Beobachtungszeit von 12 h bis 48 h bestehen.

3.3 Mechanismus der optimierten Expression minimalistischer Vektoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die minimalistischen Vektoren Minicircle und MIDGE ihren parental Plasmiden überlegen sind, wurde die Frage nach der Ursache des erhöhten Expressionsniveaus untersucht. Dazu wurden Gentransfereffizienz, intrazelluläre Vektorverteilung und Vektormenge sowie die Expression auf mRNA-Ebene betrachtet. Für diese Untersuchungen wurde die humane Melanomlinie A375 verwendet, da sie sich in den vergleichenden Expressionsanalysen (Kapitel 3.2) als optimal erwiesen hat.

3.3.1 Vergleich der Gentransfereffizienz

Die Gentransfereffizienz wurde mit Hilfe GFP-kodierender minimalistischer Vektoren und ihrer parental Plasmide (Kapitel 2.1) untersucht. Sie wurden wiederum äquimolar mit Hilfe von Transfektion und Elektroporation und den bereits beschriebenen Protokollen (Kapitel 2.3.1) in die Zellen eingebracht. Nach 12, 24 und 48 h wurden die Zellen geerntet und im FACS quantitativ analysiert.

Mit Hilfe der FACS-Analyse konnte zu den untersuchten Zeitpunkten eine leicht gesteigerte Gentransfereffizienz bei Verwendung der minimalistischen Vektoren Minicircle und MIDGE gezeigt werden (Abbildung 14). Diese Steigerung nahm über den Beobachtungszeitraum von 12 h bis 48 h zu und lag im Bereich von bis zu 3-fach für 48 h nach Transfektion (Abbildung 14) und bis zu 5-fach für 48 h nach Elektroporation (Abbildung 14).

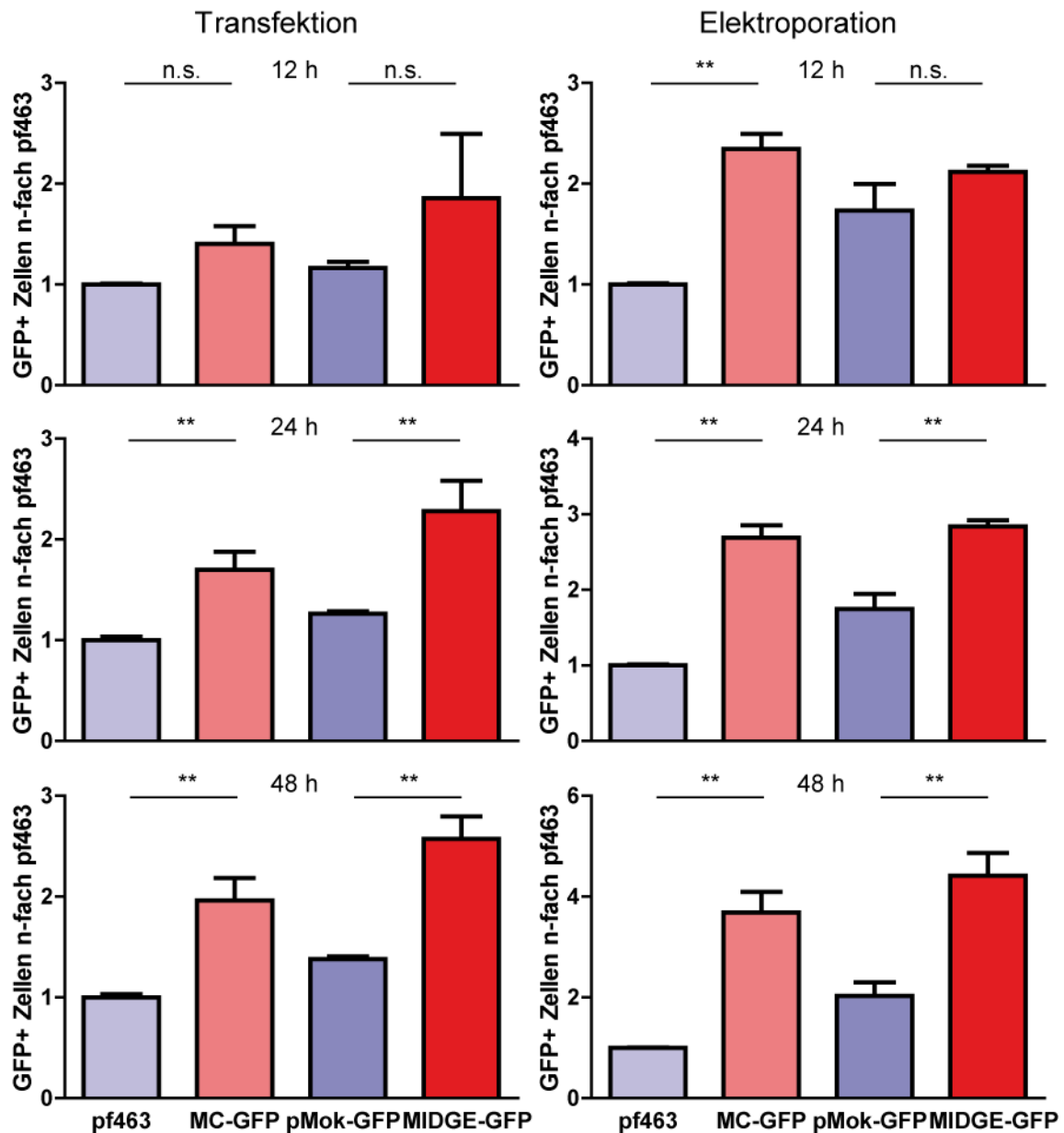


Abbildung 14: Gentransfereffizienz minimalistischer Vektoren in A375 Zellen
 Exemplarisch ist für die Zelllinie A375 die n-fache Veränderung der GFP-positiven Zellen nach äquimolarem Gentransfer (Transfektion und Elektroporation) nach 12, 24 und 48 h dargestellt (pf463=1). Mit Hilfe der minimalistischen Vektoren Minicircle und MIDGE konnten zu jedem Zeitpunkt mehr Zellen als Transgen-positiv nachgewiesen werden. Abkürzungen: n.s.- Unterschied nicht signifikant, **.- Unterschied sehr signifikant mit $p \leq 0,01$, Analyse mit Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; n=3 unabhängige Experimente

3.3.2 Qualitative und quantitative Analyse der Vektorakkumulation

Auch die Menge der transferierten Vektoren kann die Genexpression beeinflussen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die verwendeten Vektoren mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes (Cy3) chemisch markiert und die Zellen 12, 24 und 48 h nach Gentransfer mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie und FACS analysiert. Auf diesem Weg kann die Vektorakkumulation auf Einzelzellniveau detailliert verfolgt werden. Zusätzlich wurde mit Hilfe von qPCR geprüft, wie viele Vektorkopien in den Zellkern gelangen, da dies entscheidend für das Niveau der Transkription in eukaryotischen Zellen sein kann.

Die FACS-Analyse zeigte, dass beinahe alle Zellen Vektor-DNA enthalten. Dies gilt für die untersuchten Zeitpunkte 12, 24 und 48 h nach Gentransfer (exemplarisch 24 h nach Gentransfer, Abbildung 15). Auch die größenkorrigierte mittlere Fluoreszenz (die unterschiedlich großen Vektoren bringen verschiedene Mengen Cy3-Label in die Zellen) innerhalb einer Gentransfermethode ist zu einem gegebenen Zeitpunkt nahezu konstant (Abbildung 16). Dies zeigt, dass vergleichbare Vektormengen in die Zellen eingebracht wurden. Beim Vergleich von Transfektion und Elektroporation zeigte sich allerdings, dass mit Hilfe der Transfektion wesentlich mehr markierte Vektormoleküle in die Zellen transferiert wurden. Dies zeigte sich im FACS in der Zunahme der Cy3-Intensität um bis zu 1,5 log-Stufen. Nach Gentransfer mit Hilfe der Elektroporation konnte ein Rückgang der Cy3-Fluoreszenz bereits nach 24 h beobachtet werden (Abbildung 16). Das weist auf einen Rückgang der intrazellulären Vektormenge hin. Dieser Effekt konnte sogar stärker auch 48 h nach Elektroporation beobachtet werden (Abbildung 16). Nach 48 h war nur noch ein fünftel des Vektorgehalts des 12 h Zeitpunkts vorhanden. Ein Rückgang der Cy3-Fluoreszenzintensität konnte nach Transfektion erst nach 48 h beobachtet werden (Abbildung 16). Der intrazelluläre Vektorgehalt nahm nach Transfektion innerhalb von 24 h bis 48 h um den Faktor 2 ab. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnten diese Befunde bestätigt werden. In vektorfreien Zellen wurde keine Cy3-Fluoreszenz nachgewiesen. Es konnte in nahezu allen Zellen nach Gentransfer der jeweilige Cy3-markierte Vektor dargestellt werden. Auch hier wurde in den Zellen nach Transfektion mehr Vektor-DNA gefunden, als nach Elektroporation. Dies zeigte sich an einer Zunahme der Expositionszeit für Cy3 um den Faktor 50 in den elektroporierten Zellen zur Visualisierung der DNA. Auch der Rückgang der Vektormoleküle über die Zeit konnte nachvollzogen werden. Im Falle der Elektroporation liegt man im Bereich der Nachweisgrenze für die Cy3-Fluoreszenz, vor allem für die Zeitpunkte 24 h und 48 h nach Gentransfer.

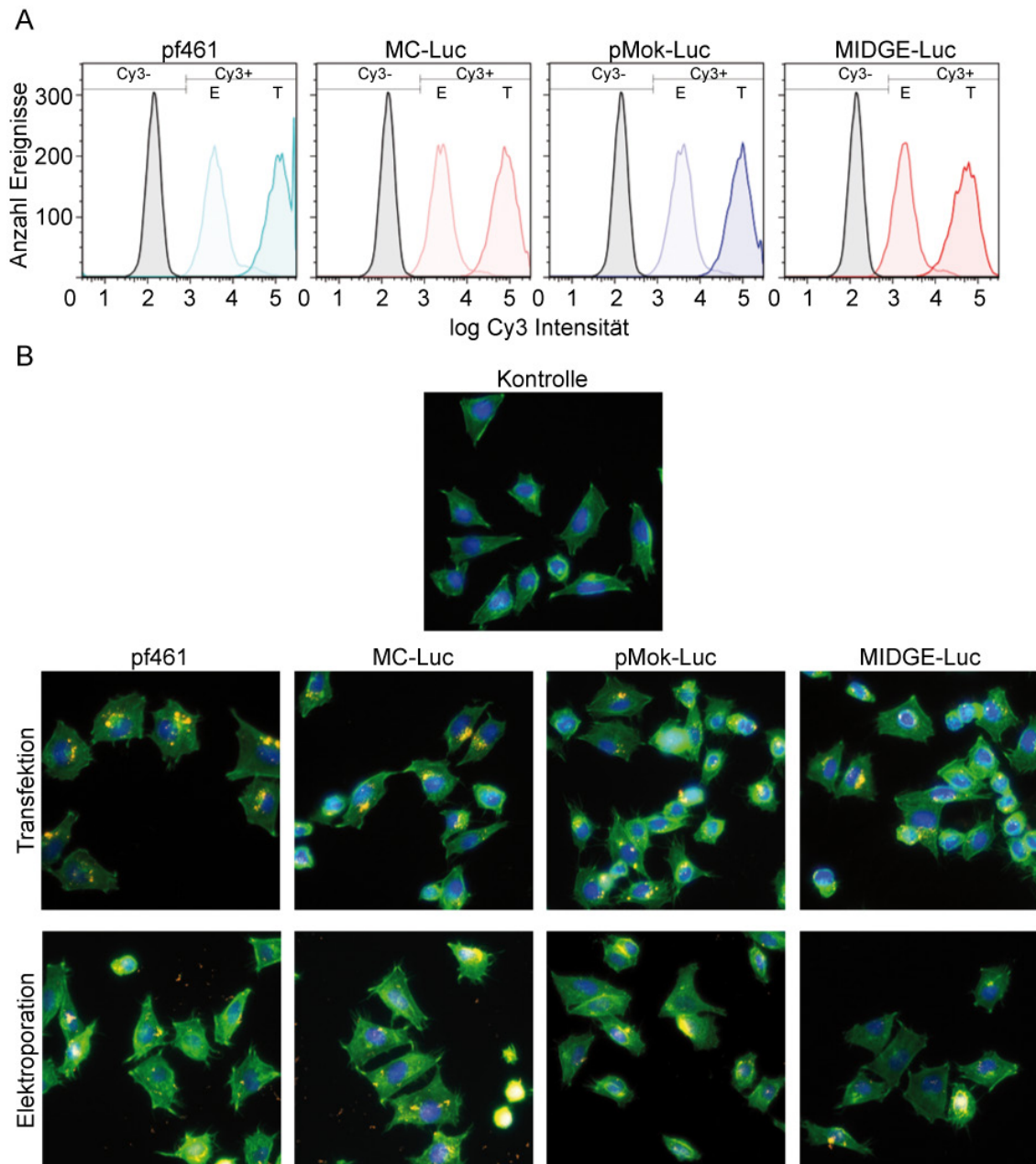


Abbildung 15: Quantitative und qualitative Analyse der Vektorverteilung (24 h)

Cy3-markierte Vektor-DNA wurde äquimolar mit Hilfe von Elektroporation und Transfektion in die Zellen eingebracht und nach 12, 24, und 48 h analysiert. Exemplarisch zeigt die Abbildung die Analyse nach 24 h im FACS (A) und in der Fluoreszenzmikroskopie (B). Die FACS-Analyse zeigt, dass 100% der Zellen markierte DNA in vergleichbaren Mengen enthalten (A; E- Elektroporation, T- Transfektion, schwarz- Zellen ohne Vektor-DNA). Die Fluoreszenz-mikroskopische Analyse zeigt keine Unterschiede in der Vektorverteilung in den Zellen (B). Die Cy3-markierte DNA ist orange dargestellt, die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau), das Zytoskelett wurde mit Hilfe von Phalloidin-Fluorescein (Phallotoxine binden an Aktin) dargestellt (grün).

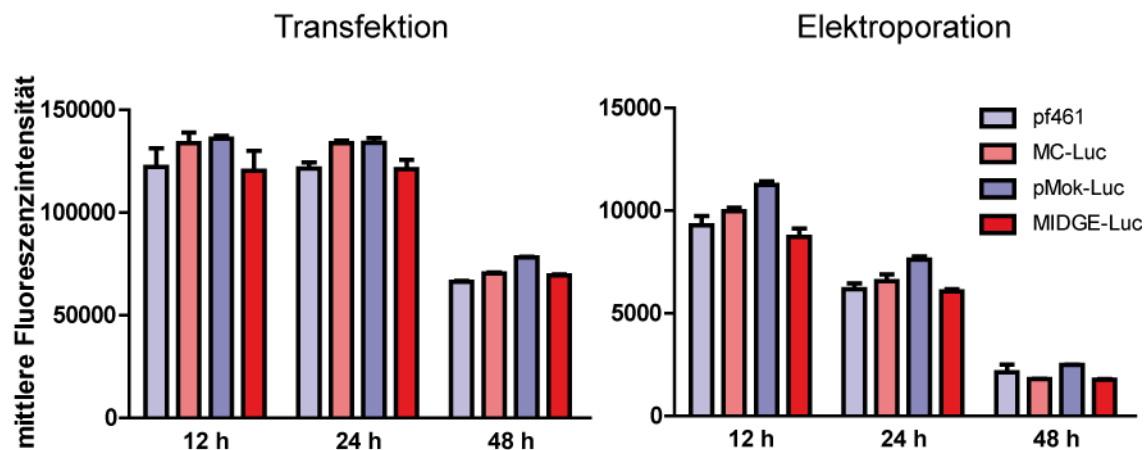


Abbildung 16: Mittlere Cy3-Fluoreszenzintensität der FACS-Analysen

Die Cy3-Fluoreszenzintensitäten der Cy3-markierten DNA können für eine relative Vektorquantifizierung genutzt werden. Es zeigte sich nach äquimolarer Transfektion bzw. Elektroporation eine vergleichbare Menge der verschiedenen Vektoren zu einem gegebenen Zeitpunkt in den Zellen. Die Unterschiede innerhalb der Zeitpunkte waren nicht signifikant. Statistische Analyse mit 1-Way-ANOVA mit *Dunn's multiple comparison posttest*; n=2 in Duplikat

Nachdem keine Unterschiede in der Vektorverteilung der jeweiligen Vektoren zwischen den Zellen und der intrazellulären Vektormenge nachgewiesen werden konnten, wurde untersucht, ob eine erhöhte Vektormenge im Zellkern nachweisbar ist. Nach äquimolarem Gentransfer wurden zunächst die Zellkerne und anschließend die DNA isoliert.

In diesen Experimenten konnten nur geringe Veränderungen in der intranukleären Vektormenge nachgewiesen werden, die die Steigerung der Transgenexpression ebenfalls nicht erklären können (Abbildung 17). Im Falle der Elektroporation wurden sogar eher weniger Vektorkopien der minimalistischen Vektoren im Zellkern nachgewiesen, als von den parentalen Plasmiden. Insgesamt waren die Unterschiede in der Vektormenge im Zellkern nicht signifikant. Allerdings zeigte sich wieder der Unterschied der insgesamt übertragenen Vektormenge zwischen Transfektion und Elektroporation. Mit Hilfe der Transfektion wurden im Bereich von 10^2 - 10^3 -Mal mehr Kopien in den Zellkern eingebracht, als mit der Elektroporation.

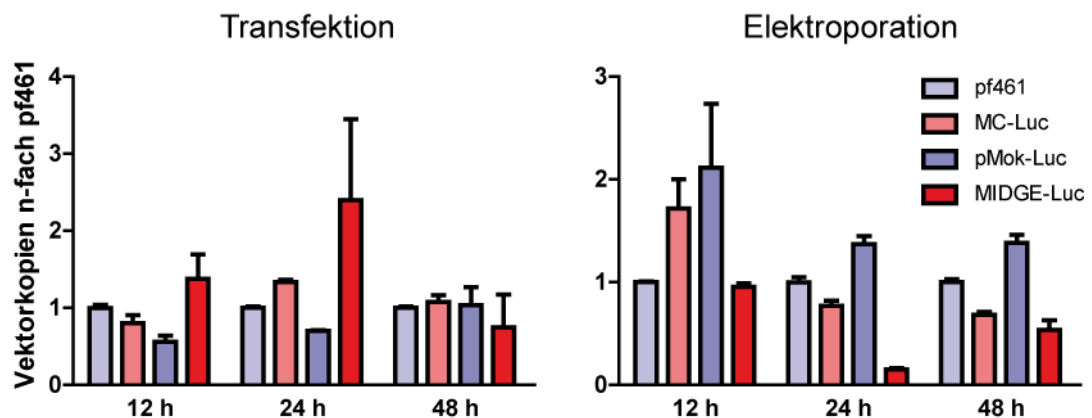


Abbildung 17: Vektorakkumulation im Zellkern von A375-Zellen

In den Zellkernen von A375-Zellen wurden nach äquimolarem Gentransfer der verschiedenen parentalen Plasmide und der minimalistischen Vektoren kaum Veränderungen der Vektorkopienzahl mit Hilfe von qPCR nachgewiesen. Statistische Analyse mit 1-Way-ANOVA mit *Dunn's multiple comparison posttest*; n=2 in Duplikat

3.3.3 Quantitative Analyse der Transgenexpression auf mRNA-Ebene

Die Analyse der Transgentranskription sollte nun zeigen, ob die gesteigerte Transgenexpression auf eine erhöhte mRNA-Synthese zurückzuführen ist. Nach äquimolarem Gentransfer mit Hilfe von Transfektion und Elektroporation wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Die quantitative Analyse erfolgte im LightCycler (Kapitel 2.4.3).

Die quantitative Analyse der Transgenexpression auf mRNA-Ebene zeigte eine signifikante Steigerung der mRNA-Transkription bei Verwendung der minimalistischen Vektoren Minicircle und MIDGE verglichen mit ihren parentalen Plasmiden (Abbildung 18). Diese Steigerung lag im Bereich von bis zu 10-fach bei Verwendung der Transfektion. Wird die physikalische Gentransfermethode Elektroporation verwendet, so kann bei Transfer des linearen MIDGE-Vektors eine Steigerung der mRNA-Expression um bis zu 10^3 -fach beobachtet werden. Auch zwischen den zwei verwendeten Transfermethoden wurden deutliche Unterschiede nachgewiesen. Während nach Transfektion mit Hilfe aller Vektoren eine relativ starke Luziferase-Transkription nachgewiesen werden konnte, lag die Transkription nach Elektroporation der zirkulär geschlossenen Vektoren (pf461, MC-Luc und pMok-Luc) sehr niedrig. Erst bei Verwendung des linearen MIDGE-Vektors konnte eine Transkription auf dem Niveau der Transfektion nachgewiesen werden.

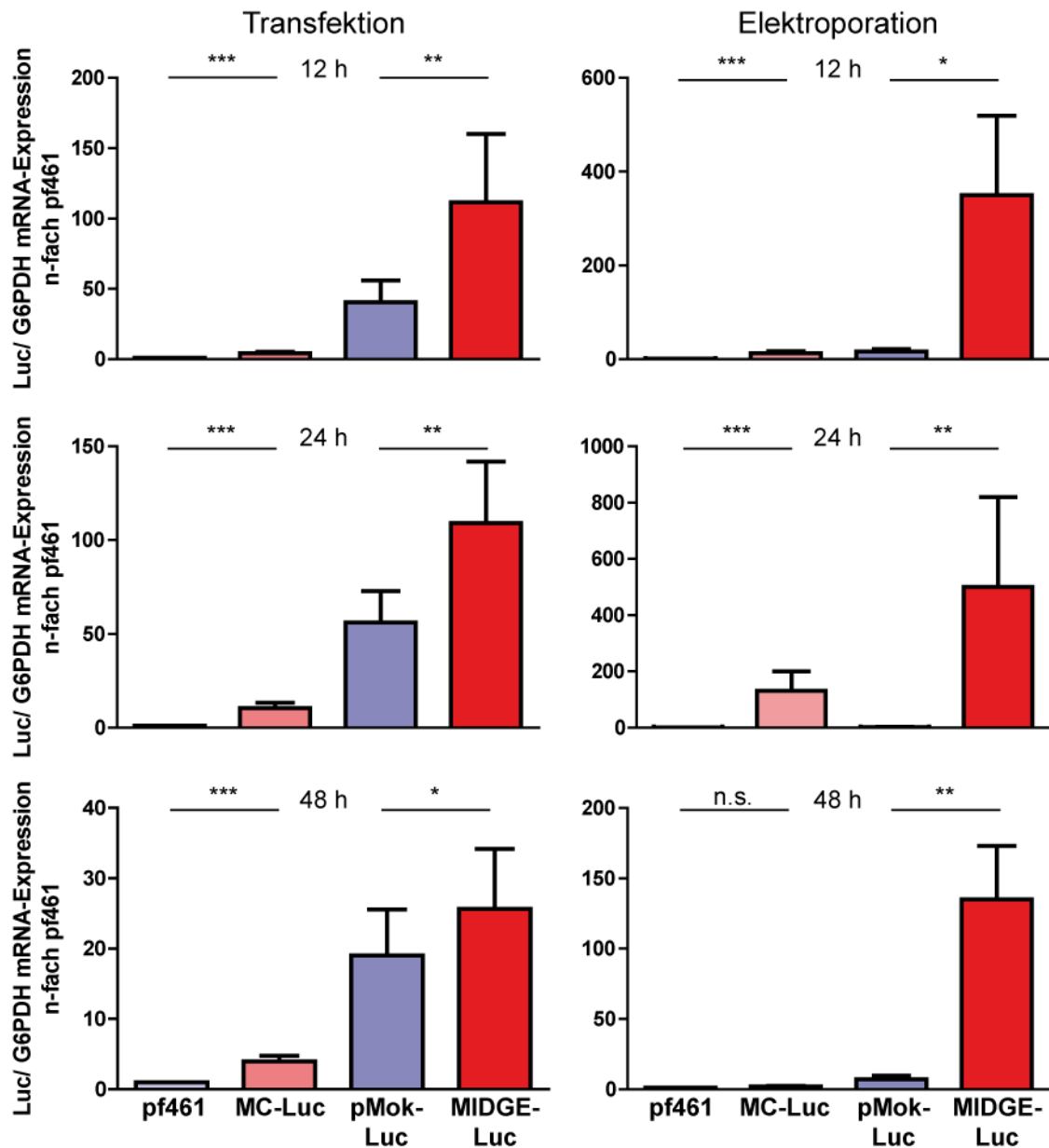


Abbildung 18: *Quantitative Analyse der Transgenexpression auf mRNA-Ebene*

Nach äquimolarem Gentransfer wurde die RNA aus den Zellen isoliert und die mRNA des Transgens quantifiziert. Es zeigte sich eine deutliche Steigerung der mRNA-Synthese des Luziferase-Transgens bei Verwendung der minimalistischen Vektoren. Das Expressionsniveau nach Gentransfer von pf461 wurde zu jedem Zeitpunkt eins gesetzt. Abkürzungen: n.s.- Unterschied nicht signifikant, *- Unterschied signifikant $p \leq 0,05$, **- Unterschied sehr signifikant mit $p \leq 0,01$, ***- Unterschied hoch signifikant mit $p \leq 0,001$; Analyse mit Wilcoxon-Mann-Whitney-Test $n=4$

3.3.4 Zusammenfassung Mechanismus der optimierten Expression minimalistischer Vektoren

Die Verwendung der minimalistischen Vektoren führt zu einer Erhöhung der Transgenexpression. Mit Hilfe von FACS und GFP als Transgen konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von minimalistischen Vektoren mehr Zellen das Transgen exprimieren. Der Gentransfer von Cy3-markierter DNA und die anschließende Analyse mit Hilfe von FACS und Fluoreszenzmikroskopie zeigten, dass nahezu alle Zellen nach äquimolarem Gentransfer den Vektor in vergleichbaren Mengen tragen. Auch die detaillierte Analyse der Vektormenge in den Zellkernen mit qPCR zeigte keine Unterschiede in der intranukleären Vektorakkumulation. Es konnte allerdings mit allen Methoden beobachtet werden, dass nach Transfektion mehr Vektorkopien in den Zellen nachweisbar sind. Die Transkriptionsanalyse nach äquimolarem Gentransfer zeigte eine stark gesteigerte Transkription bei Verwendung der minimalistischen Vektoren, sowohl nach Transfektion als auch nach Elektroporation. Vor allem der MIDGE-Vektor zeigte eine stark erhöhte Transkription nach Elektroporation im Vergleich zu den zirkulär geschlossenen Konstrukten. Der MIDGE-Vektor zeigte die beste Performance für den transienten Gentransfer. Da *in vivo* und klinisch eine physikalische Gentransfermethode (die Jet-Injektion) Anwendung finden soll, wird für die folgenden *in vitro* und *in vivo* Experimente der MIDGE-Vektor und sein parentales Plasmid für die Expression eines therapeutischen Transgens, dem humanen $\text{TNF}\alpha$, verwendet.

3.4 *In vitro* Untersuchungen der MIDGE-vermittelten $\text{hTNF}\alpha$ -Expression

Der MIDGE-Vektor ist für den nicht-viralen transienten Gentransfer der optimale Vektor (Kapitel 3.2, 3.3). Dies konnte *in vitro* mit Hilfe von Reportergenkonstrukten gezeigt werden. Für den klinischen Einsatz sind diese Reportergene nur für sogenannte Markergen-Studien geeignet, da sie kein therapeutisches Potential besitzen. In dieser Arbeit wird der humane Tumornekrosefaktor-alpha ($\text{hTNF}\alpha$) als therapeutisches Transgen verwendet. Im Folgenden wurde der MIDGE-Vektor im Vergleich zum parentalen Plasmid pMok- $\text{hTNF}\alpha$ untersucht. Da $\text{hTNF}\alpha$ allein für viele Tumormodelle, wie auch für Melanome, nur eine begrenzte antitumorale Aktivität besitzt, sollte es mit einer Chemotherapie kombiniert werden. Hierzu wurde das klinisch für die Melanomtherapie eingesetzte und als Chemotherapeutikum zugelassene Vindesin

(Eldesine®) verwendet. Dabei wirkt hTNF α chemosensitivierend, d.h., die Wirkung des Chemotherapeutikums soll bei Reduktion der Zytostatikakonzentration verstärkt werden.

3.4.1 Vergleich der *in vitro* hTNF α -Expression

Es wurde zunächst geprüft, ob der MIDGE-Vektor auch mit hTNF α als Transgen dem parentalen pMok Plasmid überlegen ist. Hierfür wurde 96 h nach äquimolarem Gentransfer die sezernierte Menge hTNF α im Kulturüberstand der sechs untersuchten humanen Zelllinien (A375, MeWo, SKMel-5, SK-MEL-28, HCT116, SW480) mit Hilfe eines spezifischen ELISAs für aktives, humanes TNF α quantifiziert. Exemplarisch zeigt Abbildung 19 die Auswertung des hTNF α ELISAs nach äquimolarer Transfektion bzw. Elektroporation in A375 Melanomzellen.

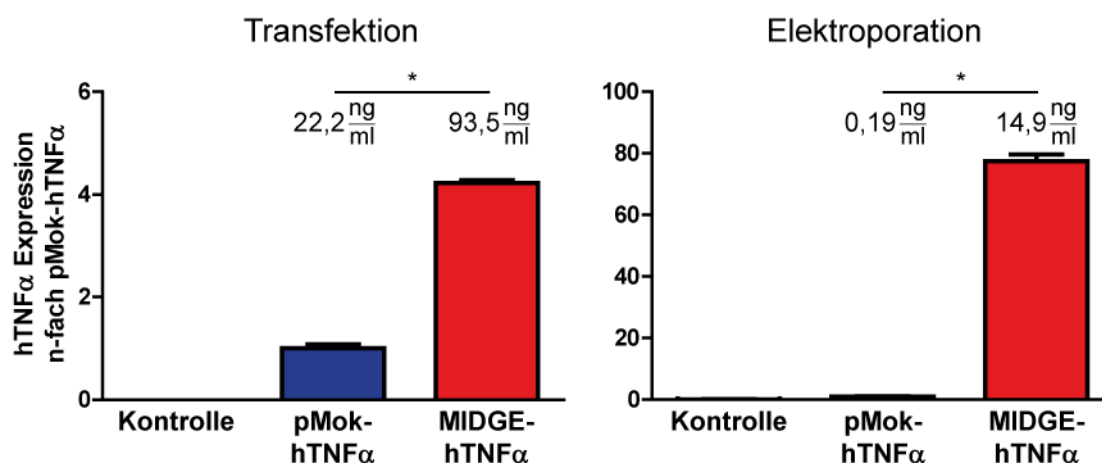


Abbildung 19: Vergleichender *in vitro* hTNF α -Gentransfer des MIDGE-Vektors und seines parentalen Plasmids pMok-hTNF α in A375 Zellen

Exemplarisch wird für die Zelllinie A375 die n-fache Veränderung der hTNF α -Expression nach äquimolarem Gentransfer (Transfektion und Elektroporation) nach 96 h dargestellt. Der MIDGE-Vektor zeigte auch für hTNF α ein höheres Expressionsniveau als das parentale Plasmid pMok-hTNF α . Abkürzungen: *- Unterschied signifikant $p \leq 0,05$, Analyse mit Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, n=2 in Duplikat

Es wurden auch hier die bereits beschriebenen Gentransfer-Protokolle verwendet (Kapitel 2.3.1). Die Vektoren wurden äquimolar zueinander aber auch zu den Luziferase-kodierenden Vektoren eingesetzt. Sowohl für die Zelllinie A375, als auch für die weiteren fünf untersuchten Linien konnte eine mindestens gleich hohe hTNF α -Expression nach Gentransfer des parentalen Plasmids oder des MIDGE-Vektors gezeigt werden (Abbildung 19, Tabelle 15). Nach äquimolarer Transfektion produzierten fünf der sechs untersuchten Zelllinien zwischen zwei bis über 7-fach mehr

hTNF α als bei Verwendung des parentalen Plasmids pMok-hTNF α . Für die Zelllinie SK-MEL-28 konnte keine Verbesserung der hTNF α -Expression beobachtet werden. Die Gesamtmenge an produziertem Transgen variierte stark zwischen den verschiedenen Zelllinien (Tabelle 15). Nach äquimolarer Elektroporation produzierten fünf der sechs untersuchten Zelllinien drei bis über 70-fach mehr hTNF α als bei Verwendung des parentalen Plasmid pMok-hTNF α . Auch hier konnte für die Zelllinie SK-MEL-28 keine Steigerung der hTNF α -Expression bei Verwendung des MIDGE-Vektors beobachtet werden.

Auffällig ist, dass nach Elektroporation des parentalen Plasmids pMok-hTNF α nur vergleichsweise wenig hTNF α im Überstand nachweisbar ist. Erst bei Verwendung des MIDGE-Vektors produzierten die Zelllinien A375, MeWo, HCT 116 und SW480 hTNF α -Mengen, die mit denen nach Transfektion vergleichbar sind.

	pMok-hTNF α [ng hTNF α /ml]	Transfektion MIDGE-hTNF α [ng hTNF α /ml]	n-fach
A375	22,16 \pm 1,73	93,53 \pm 1,40	4,22 \pm 0,06
MeWo	98,35 \pm 5,57	205,31 \pm 23,79	2,09 \pm 0,24
SKMEL-5	15,81 \pm 2,26	54,30 \pm 10,03	3,44 \pm 0,63
SK-MEL-28	132,35 \pm 2,85	133,97 \pm 3,93	1,01 \pm 0,03
HCT 116	8,25 \pm 1,28	52,94 \pm 1,17	6,42 \pm 0,14
SW480	0,42 \pm 0,02	3,18 \pm 0,05	7,53 \pm 0,12

	pMok-hTNF α [ng hTNF α /ml]	Elektroporation MIDGE-hTNF α [ng hTNF α /ml]	n-fach
A375	0,19 \pm 0,02	14,95 \pm 0,43	77,46 \pm 2,24
MeWo	2,47 \pm 0,10	50,25 \pm 2,83	20,33 \pm 1,14
SKMEL-5	1,97 \pm 0,29	6,85 \pm 1,82	3,48 \pm 0,92
SK-MEL-28	14,38 \pm 0,90	14,93 \pm 0,33	1,04 \pm 0,02
HCT 116	0,61 \pm 0,04	6,45 \pm 0,10	10,63 \pm 0,17
SW480	0,21 \pm 0,01	4,26 \pm 0,08	20,67 \pm 0,40

Tabelle 15: Vergleich der Expressionseffizienzen Plasmid- vs. MIDGE-Vektor-vermittelter hTNF α -Expression nach äquimolarem Gentransfer

3.4.2 *In vitro* Analyse der hTNF α -vermittelten Chemosensitivierung

Es konnte gezeigt werden, dass der MIDGE-Vektor *in vitro* auch mit hTNF α als Transgen zu einer erhöhten Expression führt. Es wurde nun *in vitro* untersucht, ob diese Steigerung der hTNF α -Expression auch zu einer Erhöhung der Vindesinzytotoxizität in Kombination mit hTNF α -Gentransfer führt

(Chemosensitivierung). Dafür wurde die Zelllinie A375 wiederum äquimolar transfiziert bzw. elektroporiert. Die Vindesinapplikation (Kapitel 2.3.2) wurde 24 h nach Gentransfer begonnen. Insgesamt 96 h nach Gentransfer wurde die Zellvitalität mit Hilfe des MTT-Assays analysiert (Abbildung 20, Tabelle 16).

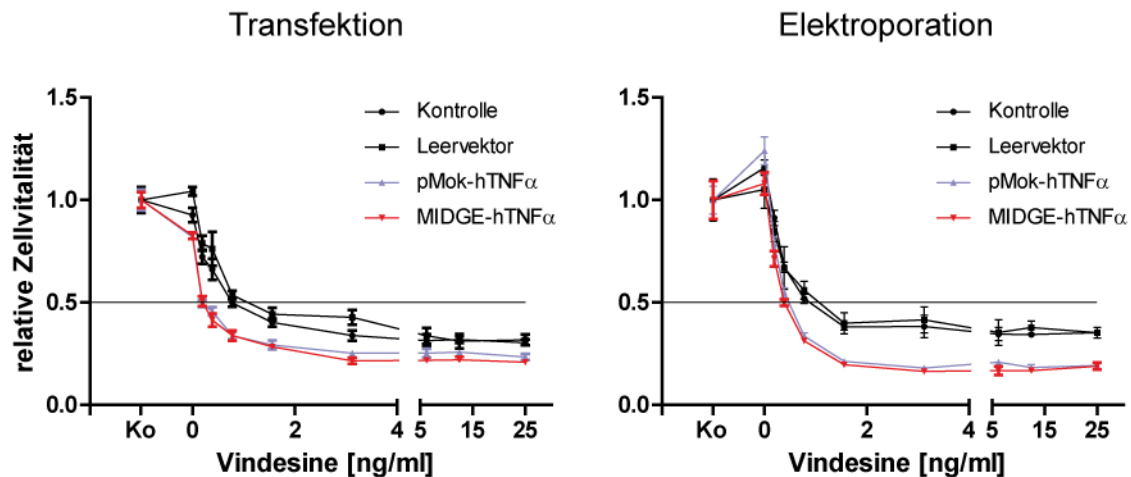


Abbildung 20: *In vitro* Chemosensitivierung der Zelllinie A375

Exemplarisch zeigt die Abbildung die MTT-Zytotoxizitätstests 96 h nach hTNF α -Gentransfer (72 h nach Vindesingabe). Als Kontrolle diente die Zelllinie A375 ohne Gentransfer. Die schwarze Linie markiert den IC₅₀ (Rückgang der Zellvitalität auf 50% der Kontrolle). Abkürzungen: Ko- keine Behandlung, 0- nur Gentransfer (Kontrolle ohne Gentransfer) ohne Vindesinebehandlung; n=2 in Triplikat; Mittelwert relativ zu Ko \pm S.E.

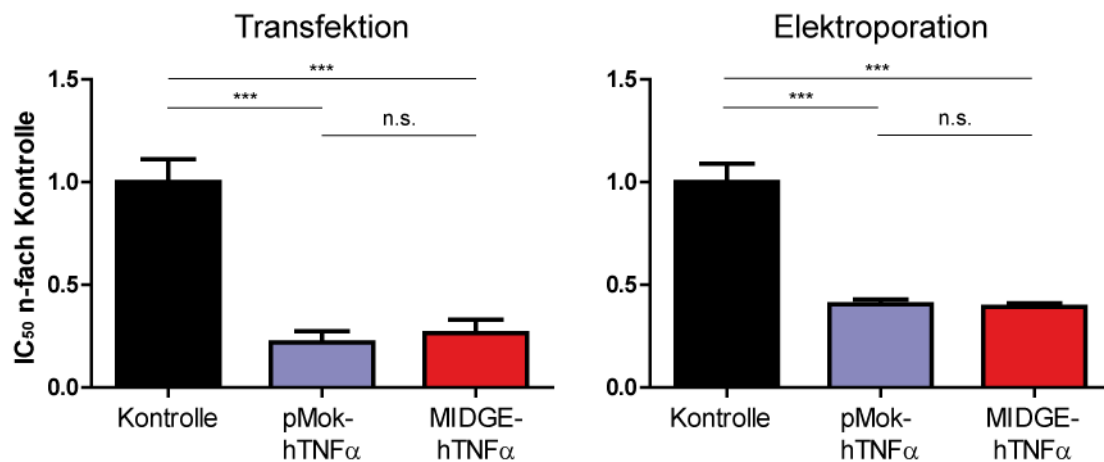


Abbildung 21: Veränderung der IC₅₀-Werte für Vindesine nach hTNF α -Gentransfer in A375 Melanomzellen

Ausgehend von den Messungen des MTT-Assays (Abbildung 20) wurde der IC₅₀-Wert bestimmt. Dargestellt wird in der Abbildung die Veränderung des IC₅₀ relativ zur unbehandelten Kontrolle. Abkürzungen: n.s.- Unterschied nicht signifikant, ***- Unterschied hoch signifikant mit $p \leq 0,001$; Analyse mit 1-Way-ANOVA mit Bonferroni's multiple comparison test n=2 in Triplikat

Mit Hilfe des MTT-Assays zur Zellvitalitätsmessung konnte nach äquimolarem Gentransfer von hTNF α -kodierenden Vektoren eine Reduktion des IC₅₀ für Vindesin in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Diese Reduktion lag im Bereich von 1,2- bis 5-fach (Abbildung 21, Tabelle 16) im Vergleich zur entsprechenden Zelllinie ohne hTNF α -Gentransfer. Dabei ist die stärkste Reduktion für die humanen Melanomzelllinien A375 und MeWo zu beobachten. Für alle Zelllinien spielte die Menge an sezerniertem hTNF α nur eine untergeordnete Rolle für die Chemosensitivierung. Selbst nach Elektroporation des parentalen Plasmids pMok-hTNF α , die zu teilweise sehr geringen Konzentrationen an hTNF α führte (Tabelle 15), reichte die Menge an hTNF α dennoch aus, um eine Chemosensitivierung wie nach Gentransfer des MIDGE-Vektors zu erreichen (Tabelle 16). Die Menge an hTNF α ist *in vitro* also kein limitierender Faktor, wenn ein ausreichend hohes Expressionslevel erreicht ist, da das sezernierte hTNF α frei im Medium diffundieren kann. Dies wird später auch *in vivo* getestet, da diese freie Verfügbarkeit des hTNF α im Tiermodell nicht gegeben sein muss.

	Transfektion			
	ohne hTNF α ng Vindesin/ml	pMok-hTNF α ng Vindesin/ml	MIDGE-hTNF α ng Vindesin/ml	IC ₅₀ n-fach ohne hTNF α vs +hTNF α
A375	0,81±0,09	0,18±0,04	0,21±0,05	0,24±0,06
MeWo	2,22±0,69	0,43±0,03	0,39±0,03	0,19±0,01
SKMEL-5	0,27±0,02	0,13±0,02	0,20±0,01	0,64±0,07
SK-MEL-28	0,83±0,11	0,64±0,06	0,58±0,04	0,74±0,06
HCT 116	0,65±0,03	0,43±0,04	0,47±0,04	0,69±0,06
SW480	0,35±0,04	0,27±0,03	0,31±0,02	0,84±0,08

	Elektroporation			
	ohne hTNF α ng Vindesin/ml	pMok-hTNF α ng Vindesin/ml	MIDGE-hTNF α ng Vindesin/ml	IC ₅₀ n-fach ohne hTNF α vs +hTNF α
A375	0,71±0,06	0,29±0,02	0,28±0,01	0,40±0,02
MeWo	2,55±0,70	0,57±0,04	0,48±0,04	0,21±0,02
SKMEL-5	0,20±0,01	0,18±0,01	0,18±0,01	0,88±0,05
SK-MEL-28	0,83±0,11	0,55±0,07	0,72±0,07	0,77±0,08
HCT 116	0,66±0,04	0,51±0,03	0,41±0,03	0,69±0,05
SW480	0,28±0,04	0,18±0,03	0,18±0,03	0,63±0,11

Tabelle 16: Vindesin IC₅₀ der untersuchten Zelllinien mit und ohne hTNF α -Gentransfer:

Die n-fache Veränderung des IC₅₀ wurde als Mittelwert der hTNF α -behandelten Zellen gegenüber den hTNF α -unbehandelten Zellen angegeben.

3.4.3 Mechanismus der erhöhten Vindesinzytotoxizität durch Chemosensitivierung mit hTNF α -Gentransfer

Die Menge an sezerniertem hTNF α war nach Gentransfer des Plasmids vor allem bei Verwendung der Elektroporation wesentlich geringer als nach Transfer des MIDGE-Vektors (Tabelle 15). Trotzdem war die Wirkung des Vindesins in nahezu identischem Maße verstärkt (Tabelle 16). Es genügen also schon Mengen von minimal 0,19pg hTNF α / ml, um die Zellen gegenüber einer Behandlung mit Vindesin zu sensitivieren. Im Folgenden wurde untersucht, welcher Mechanismus zu dieser Chemosensitivierung führt. Zunächst wurde untersucht, ob Nekrose verstärkt initiiert wird, die sich z.B. in der Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) widerspiegeln würde. Darüber hinaus wurde auch die Möglichkeit der Apoptoseinduktion über die Analyse der Aktivierung der Initiator-Caspasen 8, 9 und Effektor-Caspasen 3 und 7 detailliert untersucht.

3.4.3.1 Nekrosenachweis durch Analyse der LDH-Freisetzung

Die Freisetzung von LDH ist ein Hinweis auf den Ablauf von Nekroseprozessen (Kapitel 1.5). Während der Nekrose wird die Plasmamembran geschädigt und zytoplasmatische Enzyme werden in das Medium freigesetzt. Der LDH-Nachweis im zellfreien Medium erfolgte wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben nach äquimolarer Transfektion bzw. Elektroporation. Der Gentransfer fand 24 h vor der Vindesinbehandlung statt.

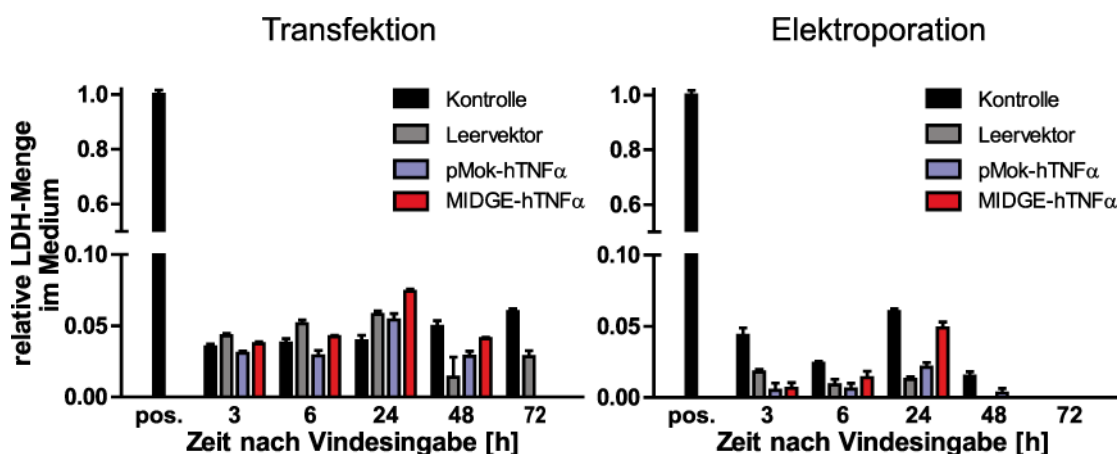


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der LDH-Freisetzung nach Behandlung von A375 Zellen mit Vindesin *in vitro*

Die LDH-Freisetzung wurde im zellfreien Kulturüberstand von A375-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Vindesinbehandlung ($c=IC_{50}$, Kapitel 3.4.2) gemessen. Die Kontrollzellen (Kontrolle) blieben ohne Gentransfer. Als Positivkontrolle (pos.) dienten 1×10^4 unbehandelte, lysierte Zellen. Dargestellt ist die LDH-Freisetzung nach Vindesingabe relativ zur maximal möglichen LDH-Menge von 1×10^4 Zellen. $n=2$ in Duplikat; Mittelwert \pm S.E.

Es konnten mit Hilfe des LDH-Assays nur sehr geringe Mengen LDH im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Abbildung 22). Diese Aussage wird durch die 20-fache LDH-Freisetzung nach Lyse von 1×10^4 Zellen gestützt. Diese Zellzahl wurde zu Beginn des Experiments eingesetzt. Auf diesem niedrigen Niveau gab es keine Zunahme an LDH über einen Zeitraum von 96 h. Dies weist auf das Fehlen von Nekrose *in vitro* nach Kombination von hTNF α -Gentransfer und Vindesinbehandlung hin.

3.4.3.2 Nachweis von Apoptose durch Analyse der Caspase-Aktivierung

Caspasen sind Schlüsselenzyme während des programmierten Zelltods (Apoptose). Die Aktivierung von Initiator-Caspasen führt im Folgenden zur Aktivierung von Effektor-Caspasen (Kapitel 1.5). Es wurde die Aktivität der Initiator-Caspasen 8 und 9 und der Effektor-Caspasen 3 und 7 untersucht.

Die Aktivierung der Initiator-Caspasen 8 und 9 und die der Effektor-Caspasen 3 und 7 ist ein deutlicher Hinweis auf die Initiation von Apoptoseprozessen. Der Gentransfer von hTNF α allein führte nicht zu einer Aktivierung dieser Caspasen. Wird allerdings der Gentransfer mit der Behandlung durch Vindesin kombiniert, so werden diese Caspasen deutlich aktiviert (Abbildung 23 A, B, Abbildung 24). Dabei werden die Initiator-Caspasen 8 und 9 12 h nach Beginn der Vindesinbehandlung und ca. 12 h vor den Effektor-Caspasen 3 und 7 aktiviert. Die Aktivität der Caspasen 8 und 9 ist 16 h nach Vindesingabe maximal und liegt nach Transfektion höher als nach Elektroporation (Abbildung 23 A, B). Bereits 24 h nach Beginn der Vindesinbehandlung geht die Aktivität der Caspasen 8 und 9 zurück, da der Zellinhalt bereits degradiert wird. Ohne hTNF α -Gentransfer ist die Aktivierung der Initiator-Caspasen deutlich reduziert. Sie steigt maximal um das 3-fache 16 h nach dem Beginn der Vindesinbehandlung.

Die Effektor-Caspasen 3 und 7 wurden 24 h nach Beginn der Vindesinbehandlung durch die Initiator-Caspasen 8 und 9 aktiviert (Abbildung 24). Ihre Aktivität stieg in den folgenden 48 h noch weiter an. Ohne Gentransfer war diese Aktivitätssteigerung um ca. 24 h verzögert. Auch hier lag die Maximalaktivität nach Transfektion höher als nach Elektroporation.

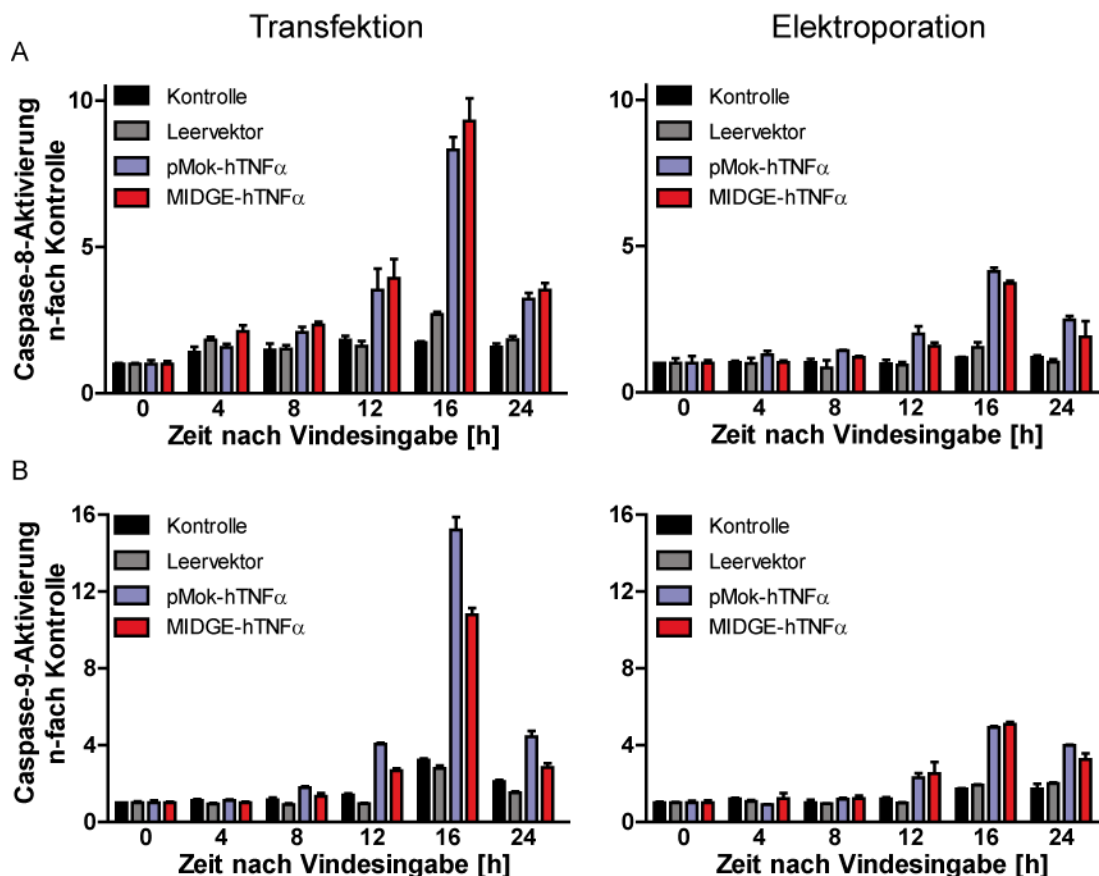


Abbildung 23: Aktivierung der Initiator-Caspasen 8 und 9

Die Vindesinbehandlung wurde 24 h nach äquimolarem hTNF α -Gentransfer begonnen. Die Aktivität der Caspasen wurde in Zelllysaten zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Die Caspaseaktivität war für die vier untersuchten Bedingungen am Beginn der Vindesinbehandlung ($c=IC_{50}$) nahezu identisch. Dargestellt wird die Zunahme der Caspaseaktivität relativ zum Zeitpunkt 0 h nach Vindesingabe. $n=2$ in Duplikat; Mittelwert \pm S.E.

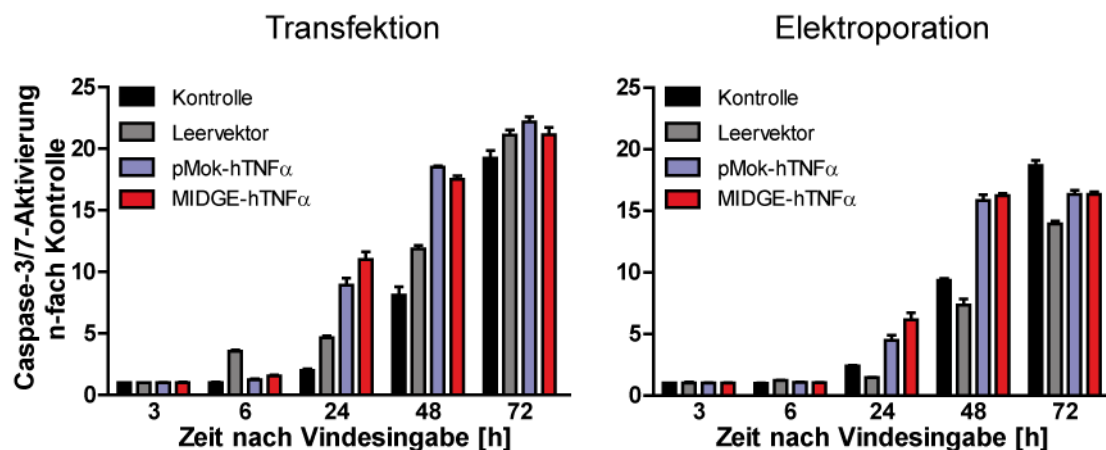


Abbildung 24: Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7

Die Behandlung der Zellen erfolgte wie bei der Analyse der Caspasen 8 und 9. Diese Caspasen aktivieren die Caspasen 3 und 7. Die Messung erfolgte im Zellkulturüberstand. Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 beginnt nach 24 h in den Zellen mit hTNF α -Gentransfer. Nach 48 h steigt auch die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in den Zellen ohne hTNF α -Gentransfer. $n=2$ in Duplikat; Mittelwert \pm S.E.

3.4.4 Zusammenfassung der *in vitro* Untersuchungen der MIDGE-vermittelten hTNF α -Expression

Nachdem sich der MIDGE-Vektor in den Reporterstudien als optimal erwiesen hat, wurde sein therapeutisches Potential *in vitro* untersucht. Dabei wurde als Transgen das klinisch relevante hTNF α verwendet. Auch der hTNF α -kodierende MIDGE-Vektor erwies sich seinem parentalen Plasmid auf der Ebene der Proteinproduktion als überlegen. Nach äquimolarer Transfektion lag die Menge an sezerniertem Transgen für fünf der untersuchten Zelllinien nach Transfer des MIDGE-Vektors über der des parentalen Plasmids. Diese Steigerung lag im Bereich von 2- bis 7-fach (Tabelle 15). Für die Zelllinie SK-MEL-28 wurde keine Steigerung der sezernierten hTNF α -Menge beobachtet.

Nach äquimolarer Elektroporation konnte für 5 der 6 untersuchten Zelllinien eine Steigerung von sezerniertem hTNF α beobachtet werden. Sie lag im Bereich von 3- bis über 70-fach (Tabelle 15). Für die Zelllinie SK-MEL-28 konnte keine Steigerung der hTNF α -Expression beobachtet werden.

Die Menge an sezerniertem hTNF α lag nach Transfektion in der Regel über der nach Elektroporation (Tabelle 15).

Durch den Gentransfer von hTNF α konnte *in vitro* die Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Vindesin gesteigert werden (Tabelle 16). Dabei spielte die Menge an exprimiertem hTNF α keine Rolle. Der IC₅₀ von Vindesin konnte um bis zu 5-fach gesenkt werden.

Mit Hilfe des negativen LDH-Nachweises nach hTNF α -Gentransfer in Kombination mit Vindesin konnte die Nekrose als Ursache für die verstärkte Vindesinwirkung ausgeschlossen werden (Abbildung 22). Durch die Analyse der Caspase-Aktivierung konnte gezeigt werden, dass nach hTNF α -Gentransfer in Kombination mit Vindesin die Aktivität der Caspasen 8 und 9, bzw. 3 und 7 früher zunimmt, als nach Vindesinbehandlung allein (Abbildung 23, 24).

3.5 *In vivo* Untersuchungen des therapeutischen Potentials der MIDGE-Vektoren

Im Kapitel 3.4 konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Kombination von hTNF α und Vindesin ein klinisch relevantes therapeutisches Potential besitzt. Im Folgenden wird untersucht, ob auch *in vivo* der MIDGE-Vektor seinem parentalen Plasmid auf der Genexpressionsebene überlegen ist, wie sich der MIDGE-Vektor systemisch im Tiermodell verteilt und wie der MIDGE-Vektor intratumoral abgebaut wird. Darüber hinaus werden Sicherheitsaspekte im Rahmen einer präklinischen Untersuchung analysiert. Ferner wird geprüft, ob die Chemotherapie mit Vindesin auch *in vivo* durch den hTNF α -Gentransfer optimiert werden kann.

3.5.1 Expression des therapeutischen Transgens hTNF α *in vivo*

Nachdem *in vitro* gezeigt werden konnte, dass die Chemotherapie mit Vindesin durch eine Kombination mit hTNF α -Gentransfer optimiert werden kann, sollte dies auch *in vivo* getestet werden. Zunächst wurde geprüft, ob auch *in vivo* der MIDGE-Vektor seinem parentalen Plasmid auf Genexpressionsebene überlegen ist. Hierzu wurden NMRI Nacktmäuse (NMRI nu/nu) humane A375 Melanomzellen subkutan in die Flanke injiziert. Innerhalb von 4 Wochen entwickelten sich Tumore. Der Gentransfer erfolgte mit Hilfe der Jet-Injektion unter Narkose mit äquimolaren Mengen von pMok-hTNF α und MIDGE-hTNF α . Die Tumore wurden 24 h nach Gentransfer entnommen, schockgefroren und anschließend aufgearbeitet, um RNA und Gesamtprotein zu isolieren (Kapitel 2.4.1, 2.4.7). Weiterhin wurde die Zeit- und Dosisabhängigkeit der hTNF α -Expression nach Jet-Injektion des MIDGE-Vektors in diesem *in vivo* Modell untersucht.

Der äquimolare physikalische Gentransfer des parentalen Plasmids pMok-hTNF α und des MIDGE-Vektors mit Hilfe der Jet-Injektion zeigte auch *in vivo* die Überlegenheit des MIDGE-Vektors (Abbildung 25). Auf mRNA-Ebene konnte nach Gentransfer des MIDGE-Vektors eine signifikante, im Vergleich zum parentalen Plasmid um bis über 25-fach gesteigerte Transkription des verwendeten hTNF α in qRT-PCR-Assays nachgewiesen werden (Abbildung 25 A). Auch auf der Proteinebene konnte in diesem Modell eine deutliche, signifikante Steigerung der Transgenexpression mit Hilfe von spezifischen ELISAs gezeigt werden. Sie lag bei bis zu über 15-fach (Abbildung 25 B).

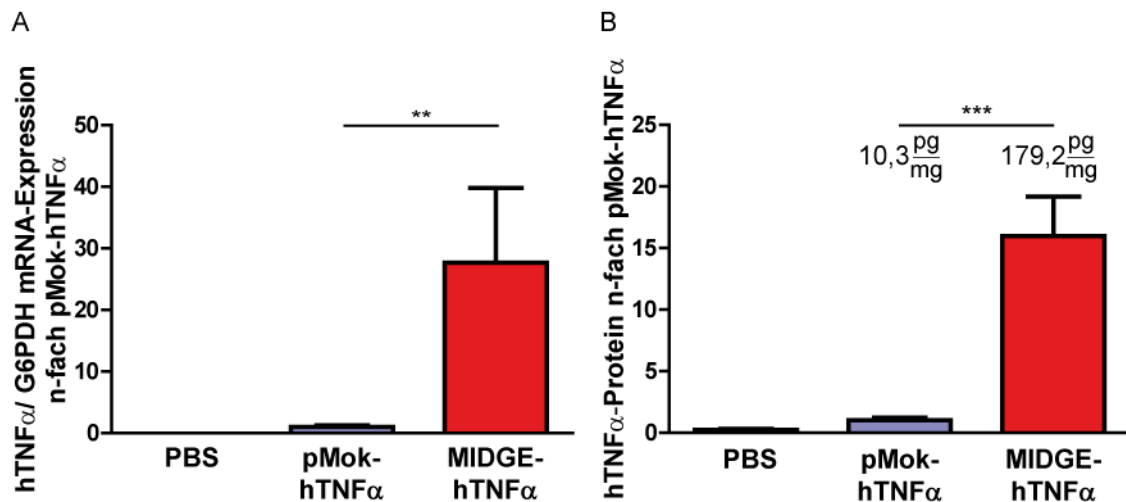


Abbildung 25: Vergleichende quantitative hTNF α -Expressionsanalyse in vivo

Die Analyse der relativen hTNF α -Expression auf mRNA-Ebene nach intratumoralem Gentransfer mit qRT-PCR zeigte eine starke Erhöhung der relativen Transgenexpression bei Verwendung des MIDGE-Vektors (A). Angegeben ist das Verhältnis von hTNF α /G6PDH. Auch auf Proteinebene konnte eine deutlich gesteigerte hTNF α -Menge im Tumor mit einem spezifischen ELISA nachgewiesen werden (B). Darstellung relativ zu pMok-hTNF α als Mittelwerte \pm S.E. mit pMok-hTNF α =1; n=5 Tiere in Duplikat gemessen, statistische Analyse mit Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; Abkürzungen: **- Unterschied sehr signifikant mit $p \leq 0,01$, ***- Unterschied hoch signifikant mit $p \leq 0,001$

Für eine klinische Anwendung des transienten Gentransfers in Kombination mit einem Chemotherapeutikum ist neben der Expressionshöhe auch die Dauer der Transgenexpression entscheidend. In Abbildung 26 wird die Zeit- und Dosisabhängigkeit der hTNF α -Expression nach Jet-Injektion des MIDGE-Vektors zusammengefasst. Es konnte eine signifikante Zeit- und Dosisabhängigkeit gezeigt werden. Mit steigender Vektormenge nahm auch die im ELISA nachweisbare Menge an hTNF α zu. Auch über die Zeit war bei Verwendung von höheren Vektordosen mehr hTNF α nachweisbar. Dabei sank die Transgenmenge bei Verwendung der kleinsten Dosis bereits innerhalb von 7 Tagen auf das Hintergrundniveau, bei Verwendung der für die Jet-Injektion optimalen Dosis (1 μg Vektor/ μl ; ergibt 50 μg Gesamtvektordosis) und der technisch realisierbaren Maximaldosis (3 μg Vektor/ μl ; ergibt 150 μg Gesamtvektordosis) konnte das hTNF α auch noch nach 7 Tagen im ELISA detektiert werden. Nach Ablauf von zwei Wochen war in allen Tieren hTNF α nur noch auf Hintergrundniveau im ELISA nachweisbar. Neben der intratumoral produzierten Menge hTNF α wurde auch untersucht, ob sich das Protein über die Blutzirkulation systemisch verteilt. Bei Verwendung eines hochsensitiven ELISAs konnte zu keinem Zeitpunkt für keine Vektordosis hTNF α -Protein im Blut nachgewiesen werden.

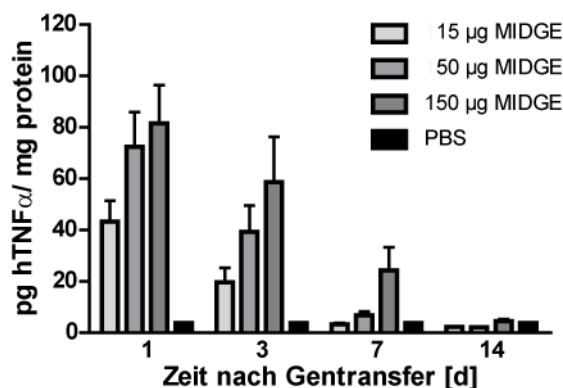


Abbildung 26: Zeit- und Dosisabhängigkeit der MIDGE-vermittelten intratumoralen $hTNF\alpha$ -Expression *in vivo*

Die Zeit- und Dosisabhängigkeit der Transgenexpression *in vivo* wurde durch Gentransfer von steigenden Mengen MIDGE-Vektor untersucht. Mit steigender Vektormenge konnte auch eine gesteigerte Menge $hTNF\alpha$ nachgewiesen werden. Die Menge an exprimiertem Transgen war 24 h nach Gentransfer am größten und nahm über den Beobachtungszeitraum ab. Es konnte ein signifikanter ($p \leq 0,05$) Einfluss der Vektordosis und ein sehr signifikanter ($p \leq 0,01$) Einfluss der Zeit nachgewiesen werden. Analyse mit zweifaktorieller ANOVA, $n=5$ in Duplikat

3.5.2 Zeit- und Dosisabhängigkeit der intratumoralen und systemischen Verteilung des MIDGE-Vektors nach Jet-Injektion

Um die Sicherheitsparameter Vektorverteilung und Vektorabbau zu untersuchen, wurde der MIDGE-Vektor NMRI nu/nu Tieren intratumoral in drei verschiedenen Dosen mit der Jet-Injektion appliziert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Tiere getötet und Organe, Blut- und Tumorproben gesammelt, um die intratumorale und systemische Vektorverteilung über die Zeit zu verfolgen (Kapitel 2.5.1).

Die intratumorale Jet-Injektion in A375 Tumore wurde von den Tieren gut toleriert. Als Sicherheitsfragen spielen Vektorverteilung und Vektorabbau eine wichtige Rolle für eine klinische Anwendung. Der intratumorale Vektorabbau ist in Abbildung 27 für den Zeitraum von 3- 14 Tagen nach Jet-Injektion gezeigt. Für die drei untersuchten Vektordosen gilt, dass bereits drei Tage nach Jet-Injektion weniger als 1% der ursprünglich applizierten Vektormenge im Tumor nachweisbar war. Sieben Tage nach Jet-Injektion waren nur noch sehr geringe Mengen Vektor-DNA im Tumor nachweisbar. Der intratumorale Vektorabbau ist innerhalb von 14 Tagen vollständig beendet.

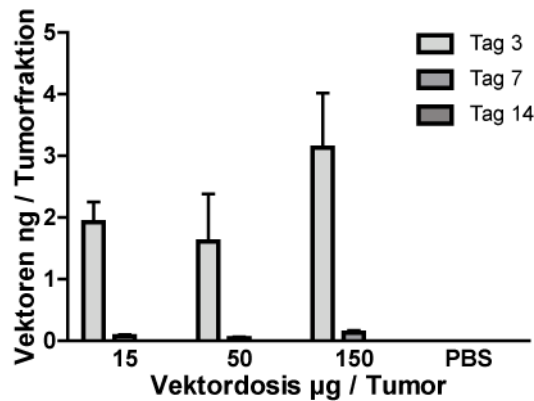


Abbildung 27: intratumoralen Vektorabbau

Die subkutan gewachsenen Tumore wurden mit drei verschiedenen Dosen MIDGE-Vektor behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Sieben Tage nach Gentransfer waren nur noch sehr geringe Mengen Vektor-DNA nachweisbar, nach 14 Tagen war der intratumorale Vektorabbau abgeschlossen. Dargestellt ist der Mittelwert aus $n=5$ Tieren \pm S.E.

Der schnelle systemische Abbau der Vektor-DNA konnte bereits in der klinischen Gentransferstudie mit Plasmid-Vektoren gezeigt werden (Kapitel 3.1.5). Auch in diesem Mausmodell konnte bei Verwendung der MIDGE-Vektoren diese schnelle Abbau-Kinetik beobachtet werden. Bereits drei Tage nach Gentransfer waren im Blut und in den Organen keine MIDGE-Vektoren nachweisbar.

3.5.3 Kombination von hTNF α -Gentransfer mit Chemotherapie *in vivo*

Abschließend wurde die Kombinationstherapie mit Vindesin und hTNF α -Gentransfer *in vivo* getestet. Es wurden wiederum NMRI nu/nu Tiere mit humanen A375-Tumoren verwendet. Die Tumore wuchsen innerhalb von 30 Tagen nach subkutaner Injektion der A375-Zellen auf die benötigte Größe heran. Die Behandlung mit Vindesin (1 mg/kg Körpergewicht) erfolgte durch eine Injektion in die Schwanzvene (i.v.) 24 h nach Gentransfer durch Jet-Injektion. Die Tumorgößen, sowie Körpergewicht und Körpertemperatur wurden zu definierten Zeitpunkten gemessen.

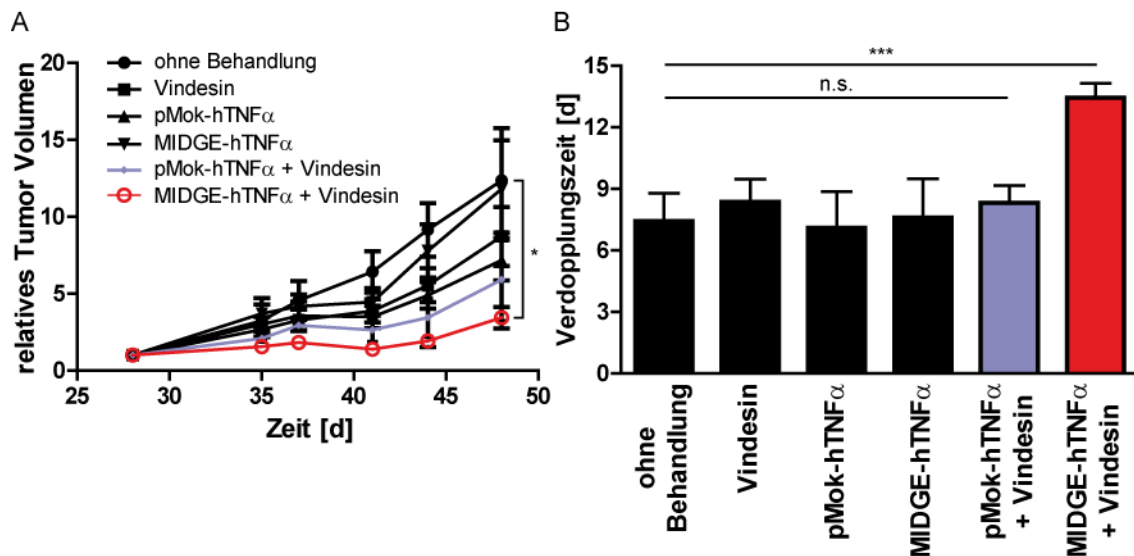


Abbildung 28: Chemosensitivierung *in vivo*

Für die Kombination von hTNF α -Gentransfer und Vindesinbehandlung wurden erneut subkutan gewachsene A375 Tumore verwendet. Der Gentransfer mit Jet-Injektion erfolgte an Tag 30 und 36, die i.v. Injektion von Vindesin erfolgte jeweils 24 h nach Gentransfer. Bei Verwendung des MIDGE-Vektors in Kombination mit der Vindesinbehandlung konnte eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums beobachtet werden (A). Diese Hemmung resultierte in einer 2-fachen Erhöhung der Tumorverdopplungszeit (B). Dargestellt wurde der Mittelwert aus $n=5$ Tieren \pm S.E.; Analyse mit 1-Way ANOVA mit *Dunn's multiple comparison posttest* (ohne Behandlung gegen jede der verschiedenen Behandlungen).

Für die *in vivo* Therapie von A375 Tumoren im Mausmodell durchliefen die Tiere zwei Behandlungszyklen aus nicht-viralem hTNF α -Gentransfer mit Jet-Injektion und Vindesinbehandlung in aufeinanderfolgenden Wochen. Vor Beginn des Gentransfers wurden die Tiere zufällig in Gruppen aufgeteilt. Wie in Abbildung 26 gezeigt, ist die Transgenexpression 24 h nach Gentransfer im höchsten, sodass dieser Zeitpunkt für die Vindesinbehandlung durch i.v. Injektion gewählt wurde. Eine Woche später erfolgte der zweite Behandlungszyklus. Am Ende des Versuchszeitraums konnte ein deutlich verzögertes Tumorwachstum nach hTNF α -Gentransfer in Kombination mit der Vindesinbehandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 28 A). Die Tumore in dieser Gruppe waren ebenfalls kleiner als die Tumore der anderen behandelten Gruppen, allerdings war dieser Unterschied aufgrund der kleinen Gruppen und relativ großen Schwankungen im Tumorwachstum nicht signifikant. Die Verdopplungszeit des Tumorumfängen lag für alle Tiere außer denen der MIDGE/Vindesin-Gruppe im Bereich von 7-8 Tagen. Bei Behandlung der Tiere mit intratumoraler Jet-Injektion in Kombination mit i.v. Injektion von 1 mg Vindesin / kg Körpergewicht stieg diese Verdopplungszeit signifikant auf über 13 Tage (Abbildung 28 B).

3.5.4 Präklinische Toxizitätsuntersuchung des MIDGE-Vektors

Die Untersuchung der MIDGE-Vektortoxizität *in vivo* erfolgte im Laboratory of Pharmacology and Toxicology (LPT) Hamburg. Sie wurde unter GLP-Bedingungen durchgeführt.

Es wurden pro Vektordosis je fünf männlichen und weiblichen NMRI nu/nu Tieren je fünf Injektionen des MIDGE-Vektors mit Hilfe des Jet-Injektors verabreicht. Dabei erhielten die Tiere entweder 50 µg oder 150 µg Vektor-DNA subkutan injiziert. Diese Vektormengen wurden ausgewählt, da sich 50 µg Vektor (entspricht 5x10 µl Vektor mit einer Konzentration von 1 µg/µl) als optimal erwiesen haben, und 150 µg (entspricht 5x10 µl Vektor mit einer Konzentration von 3 µg/µl) das derzeit technische Maximum in Produktion und Applikation der Vektoren darstellen. Zusätzlich wurde einer Kontrollgruppe PBS injiziert. Die subkutane Injektion mit Hilfe der Jet-Injektion näherte sich der geplanten klinischen Applikationsform an. Nach der Jet-Injektion wurden die Tiere über den Testzeitraum von 14 Tagen regelmäßig auf Veränderungen in Verhalten, allgemeinen Vitalfunktionen und Körpergewicht kontrolliert und dokumentiert.

Unter diesen Testbedingungen konnten keine toxischen Effekte beobachtet werden. Leichte Blutungen direkt nach der Jet-Injektion konnten schnell gestillt werden. Alle Tiere waren nach Ablauf des Testzeitraums am Leben, so dass kein LD₅₀ bestimmt werden konnte (LD₅₀>150 µg MIDGE-Vektor). Zwei der dreißig Tiere zeigten eine leicht verringerte Körpergewichtszunahme, ein weiteres Tier zeigte eine verkleinerte Niere. Diese Veränderungen lagen allerdings im Rahmen der normalen Variabilität dieser Tiere und sind nicht vektor- oder applikationsbedingt. Daneben wurden keine Veränderungen in Verhalten, Vitalfunktionen, Körpergewicht oder Anatomie festgestellt.

3.5.5 Zusammenfassung *in vivo* Untersuchungen des therapeutischen Potentials der MIDGE-Vektoren

Es konnte in den Kapiteln 3.2, 3.3 gezeigt werden, dass der MIDGE-Vektor auf Genexpressionsebene anderen nicht-viralen Vektoren und seinem parentalen Plasmid überlegen ist. Daneben zeigt dieser Vektor aufgrund seiner maximal reduzierten Größe und der daraus resultierenden Reduktion von genetischem Material außerhalb der Expressionskassette ein optimiertes Sicherheitsprofil. Die Verwendung dieses Vektors wurde in diesem Kapitel vergleichend präklinisch *in vivo* untersucht.

Es konnte mit Hilfe von qRT-PCR und ELISA gezeigt werden, dass nach äquimolarem Gentransfer durch Jet-Injektion sowohl die Menge an transkribierter mRNA für das

verwendete Transgen hTNF α als auch die Menge an translatiertem hTNF α -Protein signifikant gesteigert wurde (Abbildung 25). Es bestand eine eindeutige Zeit- und Dosisabhängigkeit der Transgenexpression (Abbildung 26). Weiterhin wurde mit qPCR ein schneller Abbau der intratumoralen Vektor-DNA innerhalb von 7-14 Tagen nach Gentransfer nachgewiesen (Abbildung 27). Die Transgenexpression folgte dieser Abbau-Kinetik. In den Organen und Blutproben wurde bereits drei Tage nach Gentransfer keine Vektor-DNA in der qPCR gefunden. Auch bei Verwendung eines hochsensitiven ELISAs konnte in den Blutproben zu keinem Zeitpunkt hTNF α nachgewiesen werden (Kapitel 3.5.1). In einem Therapieversuch konnte auch *in vivo* gezeigt werden, dass die Kombination von MIDGE-hTNF α -Gentransfer in Kombination mit Vindesin-Chemotherapie zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums führt (Abbildung 28). Abschließend wurde unter kontrollierten, GLP-konformen Bedingungen gezeigt, dass die Anwendung des MIDGE-Vektors in Kombination mit der Jet-Injektion *in vivo* im Mausmodell sicher ist (Kapitel 3.5.4).

3.6 Ausblick

3.6.1 Stabile Expression mit Hilfe der Sleeping Beauty Transposase

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass der MIDGE-Vektor Transfereffizienz und Transgenexpression steigern kann. Allerdings führt die Verwendung dieses Vektors nur zu einem transienten Gentransfer, da u.a. lineare Konstrukte nicht vollständig repliziert werden können und kein Mechanismus für eine zuverlässige Verteilung an die Tochterzellen existiert. In diesem Kapitel wird eine Möglichkeit vorgestellt, wie der MIDGE-Vektor mit einer genomischen Integration kombiniert werden kann, um eine stabile Langzeitexpression des Transgens zu ermöglichen. Dazu wird das Sleeping Beauty Transposase/Transposon-System verwendet.

3.6.1.1 Generierung der Sleeping Beauty MIDGE-Vektoren

Die MIDGE-Vektoren wurden aus den entsprechenden parentalen Plasmiden (Tabelle 4) wie in Kapitel 2.1.1.1 beschrieben, generiert. Die Synthese setzte sich aus verschiedenen enzymatischen Reaktionen und Reinigungsschritten zusammen. Als Produkt wurden die reinen MIDGE-Vektoren isoliert (Abbildung 29).

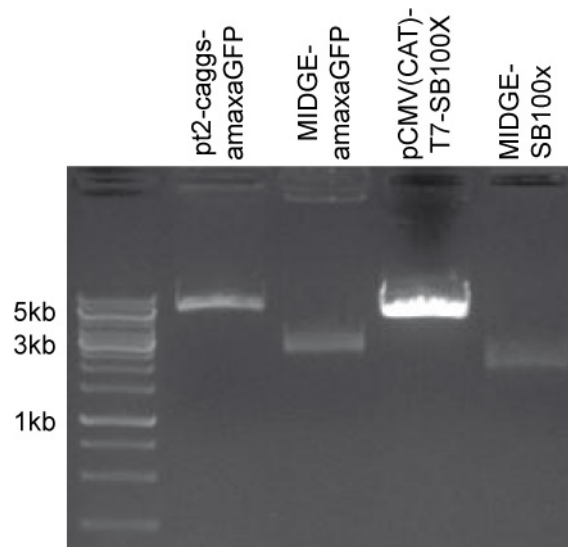


Abbildung 29: Gelelektrophorese der *Sleeping Beauty* Plasmid- und MIDGE-Vektoren

Um die Größenunterschiede der parentalen Plasmide und der daraus hergestellten MIDGE-Vektoren zu visualisieren, wurden sie mit Hilfe eines 1%-igen Agarosegels nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Plasmide wurden mit EcoRI linearisiert. Man erkennt die signifikante Reduktion des MIDGE-Vektors im Vergleich zum parentalen Plasmid.

Es konnten erfolgreich MIDGE-Vektoren mit dem *Sleeping Beauty* Transgen und der für die Transposition benötigten Transposonstruktur aus einer Expressionskassette, die von „inverted repeats“ flankiert wird, generiert werden. Das Plasmid pt2-caggs-amaxaGFP wurde von 5,6 kb auf 2,7 kb des MIDGE-Vektors reduziert, das Plasmid pCMV(CAT)T7-SB100X wurde von 4,9 kb auf 2,3 kb verkleinert. (Abbildung 29). Die MIDGE-Vektoren sind gegenüber einer Behandlung mit Exonuklease III stabil, was auf die erfolgreiche Versiegelung der Enden mit den Loops hinweist.

3.6.1.2 *In vitro* Gentransfer der Transposase/Transposon- tragenden Vektoren

Es ist nicht bekannt, ob die *Sleeping Beauty* Transposase MIDGE-Transposons als Substrat akzeptiert. Das Fehlen von flankierenden Sequenzen außerhalb des eigentlichen Transposons könnte sich negativ auf die Enzymaktivität auswirken. Um dies zu testen, wurden Plasmid- und MIDGE- basierte Transposons zusammen mit MIDGE-Transposase-Vektoren transfiziert. Zu definierten Zeitpunkten wurde geprüft, wie viele Transgen(GFP)-positive Zellen in den Kulturen zu finden sind.

Die *Sleeping Beauty* Konstrukte wurden äquimolar transfiziert. 10% der verwendeten Transposonkopien wurden von den Transposase MIDGE-Vektoren ko-transfiziert. Eine Woche nach Gentransfer wurden die GFP-positiven Zellen mit FACS isoliert (Abbildung 30 A) und für eine weitere Woche kultiviert. Bereits nach einer Woche Kultur

konnten ohne Transposase nur sehr wenige GFP-positive Zellen isoliert werden (Abbildung 30 A FACS, Abbildung 30 B Mikroskopie). Bei Verwendung des Plasmid-basierten Transposons in Kombination mit der Transposase konnte diese Zahl vervierfacht werden. Bei Einsatz des MIDGE-basierten Transposons konnte eine weitere Steigerung der GFP-positiven Zellen um den Faktor drei beobachtet werden. Auch wenn in den Transposase-behandelten Kulturen zu diesem Zeitpunkt mehr GFP-positive Zellen nachweisbar waren, als in den Kulturen ohne Transposase-Transfektion, so kann dies noch nicht als stabile Expression bezeichnet werden. Erst nach insgesamt 14 Tagen nach Gentransfer kann man von einer stabilen Expression des Transgens ausgehen.

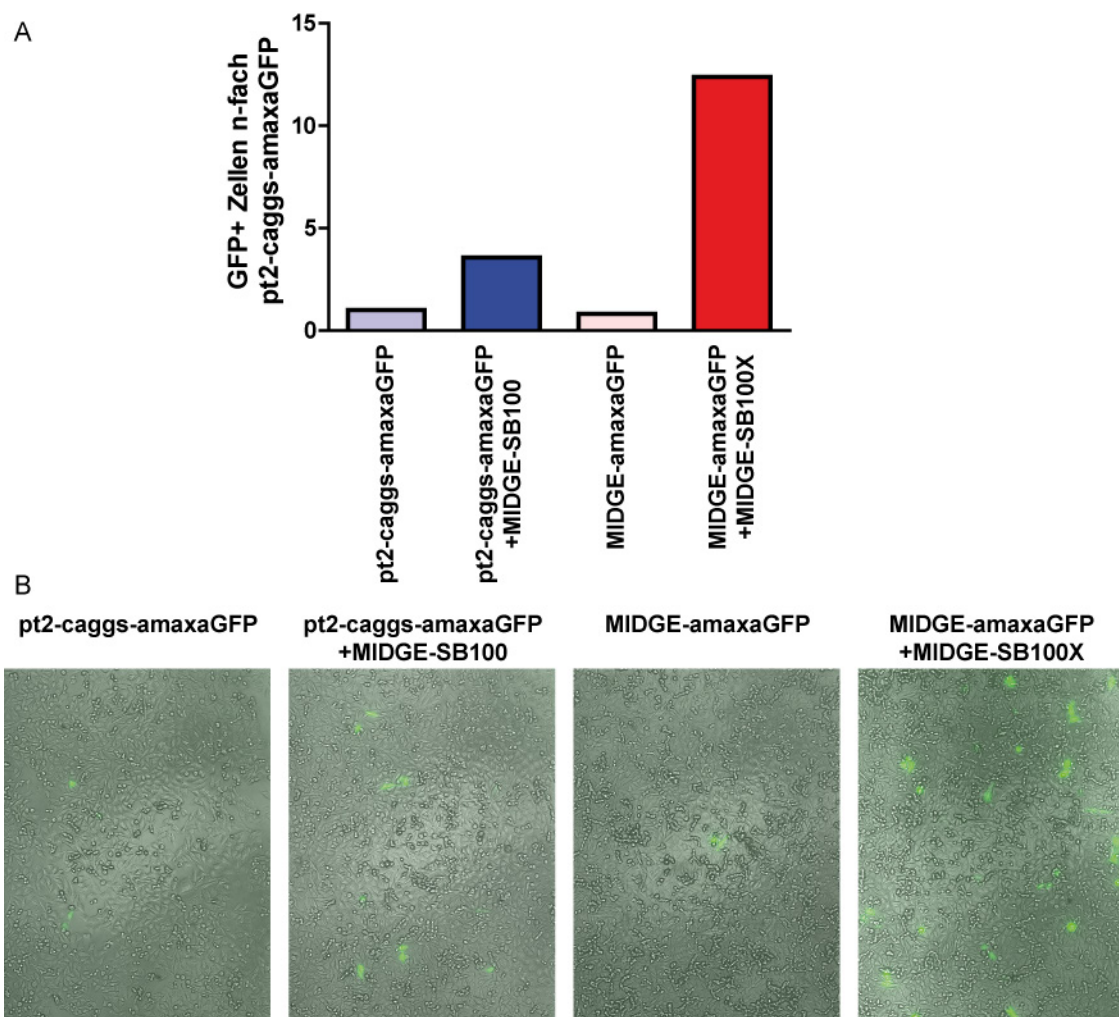


Abbildung 30: *In vitro* Transfektion der Sleeping Beauty Transposon/Transposase-Vektoren 7 Tage nach Gentransfer

Die Plasmid- und MIDGE-basierten Transposons wurden äquimolar transfiziert. Die MIDGE-Transposase-Vektoren wurden 10%ig eingesetzt (Ko-Transfektion). Eine Woche nach Gentransfer wurden die Zellen im FACS sortiert und die GFP-positiven Zellen weiter kultiviert (A). Die Verteilung der GFP-positiven Zellen vor dem Sortieren ist in (B) gezeigt. GFP-positive Zellen sind grün gefärbt.

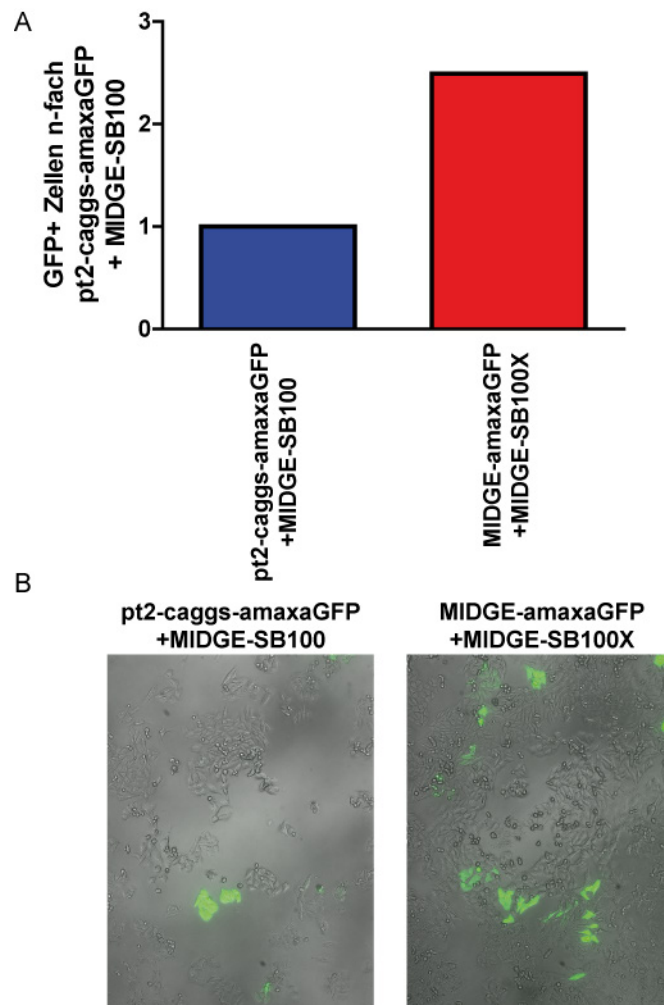


Abbildung 31: *In vitro* Transfektion der Sleeping Beauty Transposon/Transposase-Vektoren 14 Tage nach Gentransfer

Die eine Woche nach Gentransfer als GFP-positiv sortierten Zellen wurden nach einer weiteren Woche erneut im FACS sortiert (A). Die Zellen ohne Transposase-Behandlung haben innerhalb von 14 Tagen kein GFP mehr produziert. Bei Verwendung des MIDGE-Transposons konnte im Vergleich zum Plasmid-Transposon eine Steigerung der GFP-positiven Zellen um den Faktor 2,5 im FACS gemessen werden. Dies konnte auch in der mikroskopischen Analyse beobachtet werden (B).

Es konnte ohne Gentransfer der Transposase 14 Tage nach Beginn des Experiments keine GFP-Expression mehr mikroskopisch nachgewiesen werden. Diese Zellen wurden nicht weiter verwendet. Die Zellen, die neben der Transposonstruktur auch die Transposase erhielten, zeigten auch 14 Tage nach Gentransfer noch eine GFP-Expression und konnten im FACS isoliert werden (Abbildung 31 A). Es konnten erneut mehr GFP-positive Zellen bei Verwendung des MIDGE-Transposons gewonnen werden. Auch mit Hilfe der Fluoreszenz-/ Lichtmikroskopie war diese Steigerung in der Zellzahl GFP-positiver Zellen zu beobachten (Abbildung 31 B). Diese Steigerung lag im

Bereich von 2,5-fach im Vergleich zum Plasmid-basierten Transposon. Im Vergleich zu den eine Woche nach Gentransfer bereits als GFP-positiv selektierten Zellen exprimierten mehr als 95% dieser Zellen kein GFP mehr. Die Zellen, die auch 14 Tage nach Gentransfer als GFP-positiv im FACS detektiert wurden, blieben im Folgenden dann Transgen-positiv, sodass von einer stabilen Expression ausgegangen werden kann.

3.6.2 Weitere Optimierung des Gentransferprotokolls

Die Jet-Injektion allein führt bereits zu einer Genexpression. Darüber hinaus werden die verwendeten Vektoren im Vergleich zur einfachen Nadelinjektion gut im Zielgewebe verteilt. Es kann im Folgenden eine weitere Gentransfertechnologie mit der Jet-Injektion kombiniert werden, um die Gentransfereffizienz weiter zu erhöhen. Dabei erscheinen chemische Vektoren als ungeeignet, da die gebildeten Komplexe durch die während der Injektion auftretenden Scherkräfte zerstört werden können. Es wurde deshalb die Elektroporation für einen kombinierten *in vivo* Gentransfer im A375 Melanommodell ausgewählt. Hierfür wurden erneut die Konstrukte pf461, MC-Luc, pMok-Luc und MIDGE-Luc äquimolar verwendet.

Es konnte zu jedem Zeitpunkt (24 h, 48 h und 96 h nach Gentransfer) eine deutlich erhöhte Luziferaseaktivität bei Verwendung des MIDGE-Vektors im kombinierten Gentransfer aus Jet-Injektion und Elektroporation nachgewiesen werden (Abbildung 32 A-C). Im Vergleich zum nächst-schwächeren Expressionsniveau lag diese Erhöhung im Bereich von 2-fach (48 h nach Gentransfer, Abbildung 32 B) bis über 10-fach (24 h und 96 h nach Gentransfer, Abbildung 32 A, 32 C). Dabei nahm die Aktivität der Luziferase über 48 h insgesamt zu und fiel innerhalb von 96 h wieder ab. Die Transgenaktivität konnte bei Verwendung des MIDGE-Vektors am längsten auf relativ hohem Niveau nachgewiesen werden. In diesen Tieren konnte auch nach 96 h eine Luziferaseaktivität auf dem Niveau von 24 h nach Gentransfer beobachtet werden.

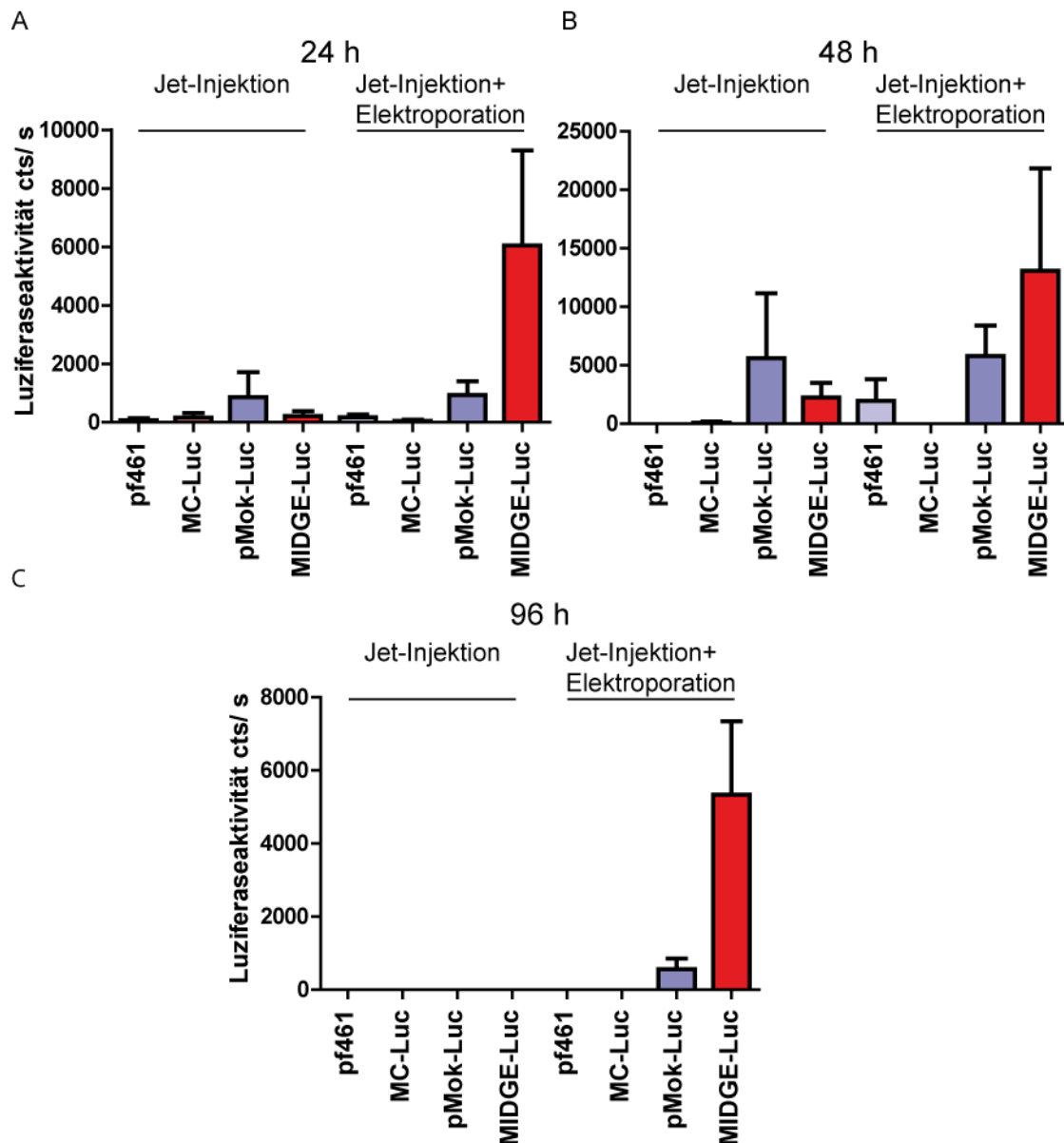


Abbildung 32: In vivo Kombination von Jet-Injektion und Elektroporation

Die Abbildung zeigt die Luziferaseaktivität über einen Zeitraum von 96 h. In s.c. auf NMRI nu/nu Tieren (n=6 pro Gruppe) gewachsene Tumore der Zelllinie A375 wurden äquimolare Mengen der jeweiligen nicht-viralen Vektoren mit Jet-Injektion appliziert. Jeweils die Hälfte der Tiere wurde direkt nach der Jet-Injektion mit der *in vivo* Elektroporation behandelt (5x 400 V/cm; 20 ms). Zu den angegebenen Zeitpunkten (24 h (A), 48 h (B) und 96 h (C) nach Gentransfer) wurde die Luziferaseaktivität *in vivo* bestimmt. Zu jedem Zeitpunkt konnte in den Tieren, die mit dem kombinierten Gentransfer aus Jet-Injektion und Elektroporation behandelt wurden, die größte Luziferaseaktivität nachgewiesen werden. Dargestellt wurde der Mittelwert aus n=3 Tieren \pm S.E.

3.6.3 Zusammenfassung Ausblick

Mit Hilfe eines initialen Experiments konnte die Herstellung von MIDGE-Vektoren, die Transposonelemente beinhalten, gezeigt werden (Abbildung 29). Diese MIDGE-Vektoren sind erneut signifikant kleiner als die parentalen Plasmide, da auch hier das Plasmidrückgrat vollständig entfernt werden konnte. Es stellte sich die Frage, ob diese Vektoren von der Sleeping Beauty Transposase für die genomische Integration als Substrat akzeptiert werden. Dieses erste Experiment zeigte, dass bei Verwendung der MIDGE-basierten Transposons in Kombination mit der Transposase mehr Zellen GFP-positiv waren, als bei Ko-Transfektion von Plasmid-basiertem Transposon mit Transposase MIDGE. Weitere Experimente zur Optimierung der Transposition und zum direkten Nachweis der Integration werden zeigen, wie die MIDGE-Vektortechnologie die Anwendung der genomischen Integration durch Transposition für die nicht-virale Gentherapie verbessern kann.

Eine weitere Strategie, die Anwendbarkeit der nicht-viralen Gentherapie weiter zu optimieren, ist die Kombination verschiedener Technologien für den effizienten Gentransfer. Hier konnte *in vivo* mit Hilfe des Luziferase-Reportergens gezeigt werden, dass die Jet-Injektion des MIDGE-Vektors durch eine nachfolgende Elektroporation weiter optimiert werden kann.

4 Diskussion

4.1 Klinische Gentransfer-Studie

Nicht-virale Vektoren und Transfertechnologien spielen eine große Rolle in der Gentherapie. Dies illustrieren die zahlreichen klinischen Studien und technischen Weiterentwicklungen auf diesem Gebiet. Sicherheitsaspekte gehören zu den großen Herausforderungen sowohl der viralen als auch nicht-viralen Gentherapie. Alle bekannten schweren Zwischenfälle im Zusammenhang mit einer Gentherapie wurden bei Verwendung von viralen Vektoren beobachtet. Neben der Sicherheit einer Gentherapie spielt auch die Transfereffizienz eine große Rolle. Bisher (Stand 2011) wurden in den meisten klinischen Studien Viren als Vektor eingesetzt, da sie eine höhere *in vivo* Transfereffizienz zeigen [217]. Aufgrund der Sicherheitsbedenken gegenüber viralen Vektoren wird auch die nicht-virale Gentherapie häufig klinisch eingesetzt und weiter optimiert. Dabei spielen die Vektoren, als auch die eingesetzte Transfertechnologie eine Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einer klinischen Phase I Studie zum ersten Mal gezeigt, dass die Jet-Injektion klinisch sicher und effektiv für die intratumorale Applikation nackter DNA angewendet werden kann. Die Jet-Injektion wurde ohne Nebenwirkungen von allen Patienten gut toleriert. Mit der Jet-Injektion nackter Vektor-DNA konnte in allen untersuchten Tumoren eine Expression des Reportergens β -Galactosidase nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte auf Transkriptionsebene (qRT-PCR) und Proteinebene (Western Blot, Immunhistochemie, funktionaler β -Galactosidase-Assay). Daneben wurden die intratumorale und systemische Vektorverteilung sowie der Vektorabbau untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass intratumoral vergleichsweise große Mengen des verwendeten Vektors nachweisbar sind. Systemisch wurde dagegen im Bereich von bis zu 10^6 -fach weniger Vektor-DNA / 250 ng genomischer DNA nachgewiesen.

Andere nicht-virale Gentransfermethoden und -protokolle setzen zum Teil wesentlich größere Mengen Vektor-DNA (bis zu 4 mg DNA) ein, oder müssen bis zu sieben Mal wiederholt werden [218, 219, 220, 221, 222, 223]. Für den intradermalen Gentransfer in Vakzinierungsstudien mit der Gene Gun erreicht die Applikation von $2 \times 2 \mu\text{g}$ Vektor-DNA bereits eine Immunantwort [224]. Mit Hilfe der intratumoralen Jet-Injektion kann die Belastung des Patienten mit Fremd DNA niedrig gehalten werden. Aufgrund der Möglichkeit, mehrfach kleine Volumina zu applizieren, kann trotz der geringen Mengen an Vektor-DNA ein großes Gewebeareal behandelt werden. Die Vektor-DNA gelangt

aufgrund des hohen Drucks während der Jet-Injektion durch die Haut direkt in das Zielgewebe und die Zellen [137]. Dabei korreliert der angewendete Druck mit der Penetrationstiefe und auch mit der Transfereffizienz [49, 143, 222, 225]. Limitierend wirken hier die Stabilität der DNA und das Gewebe, das mit zunehmendem Druck stärker geschädigt wird [143, 222]. Der lokale Gentransfer mit Hilfe von Nadelinjektionen, Kathetern oder auch mit der „high volume“ Jet-Injektion führen zur Transfektion eines begrenzten Gebietes, da die Vektor-DNA nur eingeschränkt im Gewebe bei Einzelapplikation verteilt wird [226, 227, 228]. Durch die wiederholte Applikation von Vektor-DNA im Rahmen der in dieser Arbeit verwendeten Jet-Injektion an verschiedenen Injektionsstellen bei unterschiedlichen Winkeln kann das Gebiet, welches Vektor-DNA enthält, vergrößert werden. Diese Art der Verteilung konnte bereits in anderen Arbeiten unter Verwendung unterschiedlicher Transgene beobachtet werden [143, 229, 230].

Die Aufarbeitung der Tumore in seriellen Fraktionen und die Isolation von DNA und RNA aus jeweils der gleichen Fraktion erlaubte im Rahmen der klinischen Studie eine Aussage über die intratumorale Vektormenge und Genexpression. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an Vektor-DNA mit der Genexpression korreliert. In Fraktionen mit hoher Genexpression wurde auch die höchste Menge an Vektorkopien im entsprechenden Tumor nachgewiesen. Die Verteilung der Vektor-DNA und der Genexpression variierte stark zwischen den verschiedenen Tumoren und auch innerhalb der verschiedenen Fraktionen eines Tumors. Dies wurde bereits in früheren präklinischen Studien beobachtet [143, 229]. Diese breite Verteilung der Vektor-DNA und Expressionshöhe liegt in der Art der Gentransfermethode begründet. Die Vektorlösung wird bei der Jet-Injektion auf bis zu 300 m/s beschleunigt und im Gewebe sehr unterschiedlich abgebremst, sodass es Gebiete mit hoher Vektorkonzentration und auch sehr niedriger Vektorkonzentration gibt. So bestimmen Struktur und Dichte des Gewebes maßgeblich die Vektorverteilung [137, 144, 231, 232]. Stellen mit hoher oder niedriger Transgenexpression können in direkter Nachbarschaft zueinander zu finden sein, was auf den stark lokalisierten und inhomogenen Gentransfer hinweist. Auch in diesen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Expressionshöhe der Vektorkonzentration folgte, da mit steigender Vektormenge die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Gentransfers zunimmt.

Die Vektormenge und der Vektor-Abbau im Blut der Patienten waren wichtige Sicherheitsparameter dieser klinischen Studie. Diese Parameter folgten einer reproduzierbaren Kinetik in allen untersuchten Patienten. Die größte Vektormenge im Blut wurde 30 Minuten nach dem Gentransfer nachgewiesen. Sie lag weit unter der

intratumoral nachgewiesenen Vektormenge und machte hochgerechnet auf das gesamte Blutvolumen weniger als ein Prozent der applizierten Vektormenge aus. Diese schnelle Abbau-Kinetik konnte auch in anderen Studien gezeigt werden [233, 234, 235]. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass die systemische Verteilung zu keiner detektierbaren Expression des Transgens in entfernten Organen führt, da der Druck während der Injektion nur lokal am Ort der Applikation wirkt [137, 235, 236].

Die Transfereffizienz stellt die größte Hürde für den nicht-viralen Gentransfer, vor allem bei klinischer Anwendung, dar [113, 237, 238]. Der lokale nicht-virale Gentransfer bietet sich vor allem für immunstimulatorische Therapien und den direkten intratumoralen Einsatz an. Um die Transfereffizienz zu erhöhen werden neben den Transfertechnologien (z.B. Jet-Injektion) auch die Vektoren im Rahmen dieser Arbeit optimiert.

4.2 Vergleichende Expressionsanalysen neuer minimalistischer Vektoren

In bisherigen Studien wurde viel Arbeit in die Weiterentwicklung der Transfertechnologien und Therapiemechanismen für den nicht-viralen Gentransfer investiert. Dabei wurden vor allem Plasmide als Vektor eingesetzt [163, 239]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der Etablierung einer klinisch anwendbaren nicht-viralen Gentransfertechnologie auch neuartige minimalistische Vektoren vergleichend untersucht.

Neben der Transfereffizienz spielt auch die Sicherheit der verwendeten Vektoren eine große Rolle. Nicht-virale Vektoren gelten als sicherer als virale Vektoren, da sie als nicht integrationsfähig und gering oder nicht immunogen gelten. Die zwei verwendeten minimalistischen Vektoren Minicircle und MIDGE wurden mit ihren parentalen Plasmiden und untereinander *in vitro* verglichen. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Transfereffizienz und Vektorgröße. Diese Korrelation war bei Verwendung der Transfektion mittels Lipofektion für die zwei Vektoren sehr ähnlich. Die Transfereffizienz konnte um den Faktor zwei bis vier im Vergleich zum jeweiligen parentalen Plasmid gesteigert werden. Bei Verwendung der Elektroporation wurden zum Teil wesentlich höhere Steigerungen in der Transgenexpression bei Verwendung des MIDGE-Vektors erreicht (>1000-fach). Die Steigerung der Transgenexpression war daneben auch zelllinienabhängig. Dies wurde auch in anderen Studien gezeigt [152, 162]. Diese Steigerung in der Transfektion ist nicht unter allen Bedingungen

nachweisbar. Die Wirkung der verwendeten Lipide hängt neben anderen Bedingungen stark vom Verhältnis DNA/Lipid ab. Für die äquimolare Transfektion ist es notwendig, die reduzierte DNA-Menge durch z.B. einen Leervektor zu ergänzen. Beim Fehlen dieser Leer-DNA ist es zelllinien- und protokollabhängig möglich, dass die minimalistischen Vektoren weniger effizient in die Zellen eingebracht werden [240].

4.3 Mechanismus der optimierten Expression minimalistischer Vektoren

Durch die Verwendung der minimalistischen Vektoren Minicircle und MIDGE konnte das Niveau der Reportergenexpression gesteigert werden. Dafür können verschiedene Faktoren verantwortlich sein: Bioverfügbarkeit, Endotoxinlevel der verwendeten Vektor-DNA, intrazelluläre Vektorkopienzahl oder die Transkriptionseffizienz.

Anders als in der *in vivo* Situation sollte *in vitro* die Verfügbarkeit der Vektoren nur eine untergeordnete Rolle spielen [157]. Bakterielle Endotoxine aus der Produktion der nicht-viralen Vektoren in Bakterien können die Transfereffizienz und die Genexpression beeinflussen [241, 242]. Dies kann aufgrund der Endotoxin-freien Herstellung der Vektoren (Kapitel 2.1) in dieser Studie ausgeschlossen werden. Die gezeigte Steigerung der Reportergenexpression konnte zum Teil vor allem für die Transfektion durch eine erhöhte Zahl Transgen-positiver Zellen erklärt werden [162]. Allerdings wurde auch in dieser Studie ein weiterer Mechanismus vermutet [162]. Die Zunahme der Transgenexpression (bis über 1000-fach) überstieg die zum Teil gezeigte Zunahme der Vektormenge (2- bis 3-fach) [243, 244]. Die beschriebene Zunahme (bis über 7-fach) der Kopienzahl für MIDGE-Vektoren bei Schakowski *et. al.* 2007 könnte durch die Verwendung geschlossener MIDGE-Vektoren für die Quantifizierung erklärt werden. Werden die teilweise degradierten Vektoren isoliert und mit einer Eichkurve, die mit Hilfe von intakten MIDGE Molekülen erstellt wurde, quantifiziert, so wird die Menge an intrazellulärem Vektor scheinbar erhöht. Setzt man äquimolare Mengen eines geschlossenen und eines geöffneten (ohne Hairpins) MIDGE-Vektors in der PCR ein, so erhält man für den geschlossenen Vektor spätere Signale als für den geöffneten MIDGE-Vektor. Dies gilt auch für die Quantifizierung anderer (z.B. zirkuläre Plasmide) Vektoren [215]. Die Vektorakkumulation im Zellkern zeigte für alle Vektoren eine vergleichbare Kinetik mit einer Abnahme der Vektormenge über den Beobachtungszeitraum. Mit Hilfe der Transfektion wurden wesentlich mehr Kopien in die Zellen eingebracht, als durch die Elektroporation, da die Transfektion ein kontinuierlicher Prozess ist, der über einen längeren Zeitraum abläuft. Im Gegensatz

dazu ist die Elektroporation ein einmaliges, in sehr kurzer Zeit ablaufendes Ereignis. Um die nicht-viralen Vektoren über einen längeren Zeitraum episomal in den Zellen zu erhalten, wären weitere Faktoren, wie S/MAR (scaffold/matrix attachment region) Elemente oder virale Proteine wie das große T-Antigen (large T-antigen) für die ORI-Aktivierung nötig [159]. Da die intrazelluläre Vektormenge zu einem gegebenen Zeitpunkt nahezu konstant ist, und auch die Zahl der Transgen-positiven Zellen vor allem bei der Elektroporation nicht die Zunahme der Transgenaktivität erklärt, wurde als Mechanismus der verbesserten Transfereffizienzen der minimalistischen Vektoren eine optimierte Expression vermutet. Durch die Reduzierung bzw. das Fehlen des Plasmidrückgrats mit z.B. den Resistenzgenen, ORIs und weiteren kryptischen Signalen wird die zelluläre Transkriptionsmaschinerie nicht im Plasmidrückgrat gebunden [245]. Auf diesem Weg kann die optimierte Nutzung der Expressionskassette erklärt werden. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass der parallele Transfer von Plasmid und Minicircle nicht zum Silencing des Minicircle führt. Dies weist darauf hin, dass das Plasmidrückgrat nicht in trans wirkt. Die Autoren vermuten, dass die Vektoren größenabhängig in transkriptionell inaktives Heterochromatin überführt werden [246, 247]. Die Vektortopologie hat ebenfalls Einfluss auf die Nutzung eines zirkulären Vektors. Der Minicircle-Vektor weist eine vergleichbare Verteilung der verschiedenen topologischen Plasmidformen (open circular << closed circular) wie sein parentales Plasmid pf461 auf. Hier dürfte dieser Faktor also keine Rolle spielen [157]. Der MIDGE-Vektor dagegen ist ein lineares Konstrukt. Im Vergleich zu seinem parentalen Plasmid zeigt der MIDGE-Vektor in der Transfektion ein sehr ähnliches Verhalten, da große Vektormengen in den Zellkern gelangen. Es ist vorstellbar, dass die zelluläre Transkriptions- und Translationsmaschinerie hier limitierend wirkt (Verfügbarkeit von RNA Polymerasen oder Ribosomen, bzw. Nukleotiden oder Aminosäuren). Mit der Elektroporation werden wesentlich weniger Kopien in den Zellkern eingebracht. So kann eine optimierte Verwendung des MIDGE-Vektors zum Tragen kommen, da es hier möglich erscheint, dass die Zelle mehr Transkripte oder Proteine nach Gentransfer des MIDGE-Vektors synthetisiert, als bei Verwendung der Plasmide.

4.4 *In vitro* Untersuchungen der MIDGE-vermittelten hTNF α -Expression

Der MIDGE-Vektor hat sich in den Experimenten, in denen ein Reportergen als Transgen verwendet wurde, als überlegener nicht-viraler Vektor erwiesen. Es sollte nun geprüft werden, ob diese Überlegenheit auch in einem therapeutischen Ansatz gezeigt werden kann. Für die Melanomtherapie, in der die Jet-Injektion sehr gut einsetzbar ist, können hTNF α und Vindesin als Therapie für fortgeschrittene Erkrankungen des malignen Melanoms eingesetzt werden. Dabei stehen zurzeit palliative Ansätze im Vordergrund. In den Leitlinien „Malignes Melanom der Haut“ werden u.a. verschiedene Monotherapien palliativ für das fortgeschrittene kutane Melanom empfohlen, darunter auch Vindesin [248]. Die klinische Effizienz ist für die verschiedenen Monotherapien vergleichbar. Weiterhin ist bekannt, dass die Kombination von Chemotherapie mit Zytokinen, wie dem humanen hTNF α , den klinischen Erfolg verbessern kann. Es konnte jedoch bisher keine signifikante Verlängerung des Überlebens gezeigt werden, allerdings können palliative Erfolge beobachtet werden. Da die biologische Halbwertszeit von hTNF α (6 Minuten) sehr kurz im Vergleich zur Halbwertszeit von Vindesin (24 h) ist, kann durch die Expression des hTNF α mittels Gentransfer das therapeutische Fenster durch längere hTNF α -Verfügbarkeit vergrößert werden [249, 250]. In dieser Kombination wirkt hTNF α chemosensitivierend und kann die Wirkung von Chemotherapeutika wie Vindesin verstärken [251].

Zunächst wurde in dieser Arbeit *in vitro* geprüft, ob der MIDGE-Vektor auch in Kombination mit dem therapeutischen Transgen einen Genexpressionsvorteil gegenüber seinem parentalen Plasmid zeigt. Erneut erwies sich der MIDGE-Vektor seinem parentalen Plasmid in fünf der sechs getesteten Zelllinien als überlegen [162]. In der Zelllinie SK-Mel-28 konnte keine Steigerung der Expression beobachtet werden. Dabei konnte weder für die A375 Zellen, noch in den anderen untersuchten Zelllinien eine Zytotoxizität von hTNF α nach Gentransfer beobachtet werden [252, 253]. Zelllinienabhängig liegt die Produktion von hTNF α in verschiedenen Modellen im Rahmen der in dieser Arbeit gemessenen Mengen im Bereich von pg bis ng pro ml Medium [230, 254]. Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass der Einsatz von hTNF α chemosensitivierend und auch radiosensitivierend wirken kann [254, 255]. In anderen Arbeiten konnte ebenfalls eine Synergie zwischen Chemotherapeutika und hTNF α gezeigt werden [255, 256, 257, 258]. Dies konnte in dieser Arbeit für alle untersuchten Zelllinien bestätigt werden. Die gezeigte Chemosensitivierung ist je nach verwendetem System unterschiedlichen Mechanismen

zuzuordnen und bislang nicht vollständig verstanden. So kann die Modulation von Genen der Multidrug-Resistenz eine Rolle spielen, wie auch die Inhibition der NF- κ B Zielgene, oder die Aktivierung der JNK-Kinase [255, 259, 260]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination von hTNF α und Vindesin zur Aktivierung von rezeptorvermittelter (extrinsischer Weg) und mitochondrienvermittelter (intrinsischer Weg) Apoptose führt [192]. Dabei konnte keine Nekrose nachgewiesen werden. Die Aktivität von Caspasen wie der Initiatorcaspasen 8 und 9 und die der Effektorcaspasen 3 und 7, sowie das Fehlen von LDH-Freisetzung sind deutliche Hinweise auf das Ablaufen von Apoptoseprozessen. Dabei steht Caspase 8 für den Ablauf des extrinsischen Wegs, der durch Bindung von Liganden wie hTNF α an seine Rezeptoren aktiviert wird. Wird Caspase 9 aktiviert, so läuft der intrinsische Weg ab. Er wird durch Faktoren wie Hypoxie, Strahlung oder Zellgifte (Vindesin) ausgelöst. Dies führt zu Veränderungen der Mitochondrien, sodass im Folgenden Caspase 9 aktiviert wird. Ein dritter Apoptoseweg wird durch zytotoxische T-Zellen aktiviert. Dies spielt hier keine Rolle, da *in vitro* keine T-Zellen verwendet wurden und für die *in vivo* Studien T-Zell-defiziente Nacktmäuse eingesetzt wurden. Alle drei Wege münden in die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7. Dies führt dann letztlich zur Degradierung des Zellinhalts und zum Zelltod [192]. Der hTNF α -Gentransfer allein führte im verwendeten A375-Melanommodell kaum zur Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges. Erst durch die Kombination von Vindesin und hTNF α wurden beide Wege aktiviert. Ein molekularer Mechanismus für die Aktivierung der Caspase 8 ist die Verbindung von Vindesinwirkung und c-FLIP. Dieses Protein ist ein Inhibitor der Caspase 8 und wird im Zellzyklus differentiell reguliert [261, 262]. Dabei ist die Menge von c-FLIP während der S-Phase und der nachfolgenden G₂/M-Phase niedrig [263, 264]. Vindesin wirkt als Vinca-Alkaloid durch die Inhibition der Spindelbildung während des Zellzyklus. Dabei kommt es zu einem Block des Zellzyklus in der Mitose [265]. Da nun der c-FLIP Level niedrig ist, kann durch das Signaling von hTNF α die Apoptose über den extrinsischen Weg ausgelöst werden [266, 267]. Weiterhin ist bekannt, dass die hTNF α -vermittelte Apoptose über die Bindung an TNFR-1 ausgelöst wird. Dies kann von einer Blockierung der Proteinsynthese abhängig sein. Es kann ein breites Spektrum von Zellen durch hTNF α in die Apoptose getrieben werden, wenn die Proteinsynthese inhibiert wird. Der Grund dafür liegt in der Natur der Apoptoseaktivierung. Sie ist unabhängig von einer Proteinsynthese, da die bereits benötigten Komponenten bereits vorhanden sind. Die Aktivierung von z.B. NF- κ B dagegen ist selbst kein „Überlebenssignal“, sondern erst die Expression der NF- κ B-Zielgene verlagert die

Balance in Richtung Überleben der Zelle [178]. Da Vindesin wie bereits dargestellt eine Mitoseblockade verursacht, ist die Voraussetzung für eine Signalübertragung in Richtung Apoptose gegeben, da die Proteinsynthese in der Interphase stattfindet [180, 182].

Darüber hinaus führte die Kombination beider Behandlungen zu einer früheren und stärkeren Aktivierung der Apoptose, als bei Verwendung von Vindesin allein. Die Kinetik der Caspase-Aktivierung für Gentransfer von Plasmid und MIDGE war für den Gentransfer mittels Transfektion oder Elektroporation beinahe identisch. Der hTNF α kann Zellen gegenüber Chemotherapeutika sensitivieren und so dazu beitragen, die systemische Toxizität der Tumorthherapie zu senken, da die applizierte Menge des Therapeutikums auf ein Minimum beschränkt werden kann.

4.5 *In vivo* Untersuchungen des therapeutischen Potentials der MIDGE-Vektoren

Nach den *in vitro* Untersuchungen sollte geprüft werden, ob der MIDGE-Vektor auch *in vivo* neben der erhöhten Sicherheit auch Vorteile in der Gentransfereffizienz zeigt. Erneut erwies sich der MIDGE-Vektor als seinem parentalen Plasmid überlegen. Die nachgewiesenen Mengen an hTNF α lagen dabei im Bereich von früheren Arbeiten und konnten durch die Verwendung des MIDGE-Vektors weiter gesteigert werden [230]. Diese optimierte Expression konnte auf mRNA und Proteinebene gezeigt werden. Die Menge an sezerniertem hTNF α wurde bereits als für eine Chemosensitivierung ausreichend beschrieben [230].

Um Sicherheitsaspekte der intratumoralen *in vivo* Jet-Injektion des MIDGE-Vektors zu untersuchen, wurden die Vektorverteilung und der Vektorabbau mit qPCR untersucht. Dabei zeigte sich, dass der MIDGE-Vektor eine für DNA-basierte nicht-virale Vektoren typische, sehr schnelle Abbau-Kinetik auf DNA-, mRNA- und Proteinebene [50, 113, 137, 268, 269]. Innerhalb von wenigen Tagen sind sowohl Vektor als auch Genprodukt im Blut, den Organen und im Tumor nur noch auf Hintergrundniveau nachweisbar. Zu den Sicherheitsbedenken der nicht-viralen Gentherapie gehört die genomische Integration der verwendeten Vektoren. Dies wurde bisher *in vivo* allerdings nicht beobachtet [269]. Für die Abbau-Kinetik des Transgens spielen die Art des Transgens, der Applikationsweg und -ort und die verwendete Gentransfertechnik, aber auch Faktoren wie Promotorinaktivierung durch Methylierung eine entscheidende Rolle [270]. Für hTNF α wird eine Halbwertszeit *in vivo* von wenigen Minuten

beschrieben [249, 250]. Da $\text{hTNF}\alpha$ sezerniert wird, kann er so auch extrazellulär degradiert werden. Die Applikation von nicht-viralen Vektoren in post-mitotische Gewebe (z.B. Muskel) führt zu einer längeren Genexpression, da der zelluläre Umsatz in diesen Zellen kleiner ist als in Zellen teilungsaktiver Gewebe, wie z.B. Tumoren [50, 271]. Mit Hilfe der Jet-Injektion wird nackte DNA direkt in das Zielgewebe eingebracht. Durch den verwendeten hohen Druck dürfte das gesamte applizierte Volumen den Tumor erreichen, ohne direkt nach der Injektion durch den erhöhten intratumoralen hydrostatischen Druck wieder aus dem Gewebe auszutreten [137]. Allerdings wird der Vektor durch das Blut aus dem Gewebe transportiert [113, 137]. In das Blut gelangt der applizierte Vektor aufgrund der Verletzung des Gewebes und der Gefäße während der Jet-Injektion, aber auch durch eine erhöhte Permeabilität der Gefäße im Tumor [136]. Dort wird er, wie im Tumor selbst, durch endogene Nukleasen degradiert [271]. Dieser Prozess kann durch Verwendung von geeigneten komplexbildenden chemischen Vektoren (Kapitel 1.2.1) verzögert werden, allerdings können diese dann zu einer Transfektion entfernter Organe führen. Insgesamt konnte eine schnelle Abbau-Kinetik für den MIDGE-Vektor nachgewiesen werden. Ähnlich konnte dies bereits für Plasmid-Vektoren gezeigt werden [113, 137, 272]. Trotz des Verlusts von mehr als 90% der applizierten DNA im Tumorgewebe innerhalb weniger Stunden kommt es zu einer Genexpression durch die Vektoren, die in die Zelle gelangt sind. Dabei bieten sezernierte Transgene wie das $\text{hTNF}\alpha$ den Vorteil, dass sie dann auch Tumorregionen beeinflussen können, die durch den Gentransfer nicht transfiziert wurden, da die Genprodukte in größeren Gewebearealen durch Diffusion verteilt werden. So können größere Areale durch $\text{hTNF}\alpha$ gegenüber einer Chemotherapie sensitiviert werden. Die Menge an exprimiertem $\text{hTNF}\alpha$ folgte einer klaren Zeit- und Dosisabhängigkeit. Dabei reicht das gebildete $\text{hTNF}\alpha$ aus, um den Tumor für eine weitere Therapie, wie z. B. Chemotherapie, zu sensitivieren [230]. Die Anwendung von $\text{hTNF}\alpha$ wird nicht systemisch durchgeführt, da sehr hohe Toxizitäten damit verbunden sind. Die maximale Dosis von $300 \text{ mg hTNF}\alpha / \text{m}^2$ führte nur selten zu objektiven Erfolgen, zeigte aber starke Nebeneffekte [256]. Allerdings ist die lokale Anwendung möglich. So wurde die isolierte Extremitätenperfusion (ILP) von $\text{hTNF}\alpha$ in Kombination mit einer Chemotherapie und Hyperthermie erfolgreich für die Behandlung von u.a. fortgeschrittenen Melanomen klinisch eingesetzt, da hierbei höhere $\text{hTNF}\alpha$ -Konzentrationen eingesetzt werden können [273, 274]. Diese Kombination verschiedener Therapiekonzepte war Basis für die Untersuchung von $\text{hTNF}\alpha$ -Gentherapie in Kombination mit der Vindesin-Chemotherapie im Tiermodell. Dabei konnte gezeigt

werden, dass die lokale Produktion von hTNF α den Tumor gegenüber Vindesin sensitivieren kann. Dieses therapeutische Potential wird Basis für eine in Vorbereitung befindliche klinische Phase I Studie sein. Diese Studie soll Sicherheit und Anwendbarkeit der MIDGE-basierten hTNF α -Gentherapie im Melanom untersuchen.

4.6 Ausblick

Die Protokolle der nicht-viralen Gentherapie können an zahlreichen Stellen optimiert werden. Hierbei stehen Verbesserungen der Vektoren und der Transfertechnologien im Vordergrund. Bezüglich des Vektordesigns muss z.B. berücksichtigt werden, inwieweit eine transiente oder lang anhaltende Transgenexpression für eine Gentherapie notwendig ist. In der Suizid-Gentherapie ist der Zelltod Ziel der Behandlung, um z.B. Tumorgewebe zu zerstören oder das Wachstum eines Tumors zu verlangsamen. Dafür ist die transiente Expression des Transgens ausreichend. In anderen Szenarien ist die Langzeit-Expression eines Genprodukts erwünscht. Dies können nicht-virale Vektoren wie unmodifizierte Plasmide oder die Minicircle- und MIDGE-Vektoren nicht leisten, da die Zelle nur eingeschränkt in der Lage ist, diese Konstrukte zu replizieren und stabil an die nächste Generation weiter zu geben. Zirkuläre DNA-Moleküle können bei Verwendung von entsprechenden ORIs von eukaryotischen Zellen repliziert werden. Ist alternativ eine sogenannte S/MAR-Sequenz vorhanden, so wird auch die Weitergabe der Vektoren an die Tochterzellen ermöglicht. Durch diese Sequenzen wird der Vektor allerdings vergrößert. Der lineare MIDGE-Vektor kann nicht repliziert werden, da er weder ORIs enthält, noch die Möglichkeit besteht, die Enden vollständig zu replizieren. Hier ist die genomische Integration eine Möglichkeit für eine dauerhafte Expression eines Transgens. In ersten Experimenten wurde gezeigt, wie der MIDGE-Vektor in ein Transposon/Transposase-System eingebunden werden kann. Die Sleeping Beauty Transposase wird derzeit intensiv bearbeitet, sodass bereits eine erste klinische Studie für die Reinfusion *ex vivo* durch Transposition veränderter T-Zellen durchgeführt wird [275]. Die Anwendung der Sleeping Beauty Transposase, mit der Einschränkung, dass jede Integration ein gewissen Risiko beinhaltet, gilt als sicherer als die Anwendung von viralen Systemen. Die Transposase selbst zeigte bisher kein Risikopotential für den Empfänger, und die Integration wird als weitgehend zufällig (random) beschrieben [177, 276, 277]. Die in dieser Arbeit in ersten Experimenten untersuchte Kombination von MIDGE-Vektor und Sleeping Beauty Transposon/Transposase ist eine Möglichkeit, die Sicherheit dieser Technologie weiter

zu erhöhen. Neben der Optimierung der Vektoren durch die Verwendung minimalistischer Vektoren wie MIDGE, müssen auch Aspekte wie das verwendete Gentransferprotokoll und die Integration selbst weiter optimiert werden. Die Transposition hängt vom molaren Verhältnis von Transposase und Transposon ab. Ist zu wenig Enzym vorhanden, so wirkt es limitierend auf die Integration, wird die Transposase im Überschuss exprimiert, so kommt es zur Hemmung [278]. Geht man davon aus, dass die Verwendung des MIDGE-Vektors zu einer optimierten Transkription führt, ohne die intrazelluläre Kopienzahl zu erhöhen, muss das Verhältnis Transposon zu Transposase angepasst und optimiert werden. Das hier verwendete Verhältnis von 1:10 (Transposasevektor:Transposon) hat sich für die Plasmid-basierten parentalen Vektoren als optimal erwiesen. Es wird ein Überschuss von Transposon gegenüber Transposase empfohlen [176].

Es ist nicht erwünscht, dass die Integration von genetischem Material zufällig erfolgt, auch wenn es zurzeit keine optimale Möglichkeit gibt, sie zu steuern (Targeting). Dennoch wird versucht, die Integration an die gewünschte Stelle zu leiten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dies durch Herstellung von Fusionsproteinen aus Transposase und Zinkfingerproteinen möglich ist [279].

Eine weitere Verbesserung des nicht-viralen Gentransfers stellt die Optimierung und Kombination von verschiedenen Gentransfertechnologien dar. Die Jet-Injektion führt zu einer guten Verteilung des verwendeten Vektors im Gewebe und zu einer Transgenexpression [137]. Dies kann durch eine nachfolgende Elektroporation für eine weitere Steigerung des Gentransfers durch verbesserten Zelleintritt der DNA genutzt werden. Die Elektroporation ist eine der effizientesten nicht-viralen Gentransfermethoden [280]. Ihre Effizienz hängt aber maßgeblich auch von der Vektorverteilung im Zielgewebe ab. Wird die Vektorlösung mit Hilfe einer einfachen Nadelinjektion in das Gewebe eingebracht, findet man eine stark lokalisierte Genexpression, da die Vektoren im Tumor nicht verteilt werden [281]. Diese ersten Experimente dieser Arbeit zeigen eine Möglichkeit auf, die Jet-Injektion mit Hilfe eines minimalistischen Vektors und der Elektroporation zu einer Kombinationstechnologie für den effizienteren *in vivo* Gentransfer auszubauen.

Eine wesentliche Perspektive, die sich aus dieser Arbeit ergibt, ist der Nachweis der Anwendbarkeit des MIDGE Vektors und der Jet-Injektion für die Gentherapie solider Tumore. Im Ergebnis der Arbeit ist eine klinische Phase I Gentherapie-Studie in Vorbereitung, bei der mittels intratumoraler Jet-Injektion der MIDGE-hTNF α Vektor bei Patienten mit Hautmetastasen des malignen Melanoms appliziert werden soll. Diese Studie wird die Sicherheit und Effizienz des nicht-viralen Gentransfers und der

intratumoralen hTNF α -Expression evaluieren. Unter der Voraussetzung eines erfolgreichen Abschlusses dieser Studie ist eine klinische Phase I/II Gentherapie-Studie geplant, in der die Kombination von hTNF α und einer Chemotherapie mit Vindesin auf Sicherheit und Effizienz geprüft werden soll.

Literaturverzeichnis

- [1] Lederberg, Joshua (1963): Biological Future of Man, Wolstenholme, Gordon, Man and His Future, J. & A. Churchill Ltd. , London. URL:
<http://profiles.nlm.nih.gov/BB/A/B/I/A/>
- [2] Tatum, E. L. (1966): Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine, Perspect Biol Med (Band 10), Nr. 1, Seite 19-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6002665 <http://ctt-journal.com/1-4-en-tatum-1966.html>
- [3] Raper, S. E.; Chirmule, N.; Lee, F. S.; Wivel, N. A.; Bagg, A.; Gao, G. P.; Wilson, J. M. und Batshaw, M. L. (2003): Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer, Mol Genet Metab (Band 80), Nr. 1-2, Seite 148-58. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14567964
- [4] Hacein-Bey-Abina, S.; von Kalle, C.; Schmidt, M.; Le Deist, F.; Wulffraat, N.; McIntyre, E.; Radford, I.; Villeval, J. L.; Fraser, C. C.; Cavazzana-Calvo, M. und Fischer, A. (2003): A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency, N Engl J Med (Band 348), Nr. 3, Seite 255-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12529469
- [5] McCormack, M. P.; Forster, A.; Drynan, L.; Pannell, R. und Rabbitts, T. H. (2003): The LMO2 T-cell oncogene is activated via chromosomal translocations or retroviral insertion during gene therapy but has no mandatory role in normal T-cell development, Mol Cell Biol (Band 23), Nr. 24, Seite 9003-13. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14645513
- [6] Evans, C. H.; Ghivizzani, S. C. und Robbins, P. D. (2008): Arthritis gene therapy's first death, Arthritis Res Ther (Band 10), Nr. 3, Seite 110. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18510784
- [7] Boztug, K.; Schmidt, M.; Schwarzer, A.; Banerjee, P. P.; Diez, I. A.; Dewey, R. A.; Bohm, M.; Nowrouzi, A.; Ball, C. R.; Glimm, H.; Naundorf, S.; Kuhlcke, K.; Blasczyk, R.; Kondratenko, I.; Marodi, L.; Orange, J. S.; von Kalle, C. und Klein, C. (2010): Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome, N Engl J Med (Band 363), Nr. 20, Seite 1918-27. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21067383
- [8] Li, Z.; Dullmann, J.; Schiedlmeier, B.; Schmidt, M.; von Kalle, C.; Meyer, J.; Forster, M.; Stocking, C.; Wahlers, A.; Frank, O.; Ostertag, W.; Kuhlcke, K.; Eckert, H. G.; Fehse, B. und Baum, C. (2002): Murine leukemia induced by retroviral gene marking, Science (Band 296), Nr. 5567, Seite 497. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11964471

- [9] Kohn, D. B.; Sadelain, M.; Dunbar, C.; Bodine, D.; Kiem, H. P.; Candotti, F.; Tisdale, J.; Riviere, I.; Blau, C. A.; Richard, R. E.; Sorrentino, B.; Nolta, J.; Malech, H.; Brenner, M.; Cornetta, K.; Cavagnaro, J.; High, K. und Glorioso, J. (2003): American Society of Gene Therapy (ASGT) ad hoc subcommittee on retroviral-mediated gene transfer to hematopoietic stem cells, *Mol Ther* (Band 8), Nr. 2, Seite 180-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12907140
- [10] Spitz, F. R.; Nguyen, D.; Skibber, J. M.; Cusack, J.; Roth, J. A. und Cristiano, R. J. (1996): In vivo adenovirus-mediated p53 tumor suppressor gene therapy for colorectal cancer, *Anticancer Res* (Band 16), Nr. 6B, Seite 3415-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9042200
- [11] Stein, U.; Walther, W.; Stege, A.; Kaszubiak, A.; Fichtner, I. und Lage, H. (2008): Complete in vivo reversal of the multidrug resistance phenotype by jet-injection of anti-MDR1 short hairpin RNA-encoding plasmid DNA, *Mol Ther* (Band 16), Nr. 1, Seite 178-86. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17878902
- [12] Liu, T. G.; Yin, J. Q.; Shang, B. Y.; Min, Z.; He, H. W.; Jiang, J. M.; Chen, F.; Zhen, Y. S. und Shao, R. G. (2004): Silencing of hdm2 oncogene by siRNA inhibits p53-dependent human breast cancer, *Cancer Gene Ther* (Band 11), Nr. 11, Seite 748-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15375377
- [13] Flotte, T. R. (2007): Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art, *J Cell Physiol* (Band 213), Nr. 2, Seite 301-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17577203
- [14] Moroziewicz, D. und Kaufman, H. L. (2005): Gene therapy with poxvirus vectors, *Curr Opin Mol Ther* (Band 7), Nr. 4, Seite 317-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16121697
- [15] Lee, S. S.; Eisenlohr, L. C.; McCue, P. A.; Mastrangelo, M. J. und Lattime, E. C. (1994): Intravesical gene therapy: in vivo gene transfer using recombinant vaccinia virus vectors, *Cancer Res* (Band 54), Nr. 13, Seite 3325-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8012943
- [16] Protzer, U.; Nassal, M.; Chiang, P. W.; Kirschfink, M. und Schaller, H. (1999): Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 96), Nr. 19, Seite 10818-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10485909
- [17] Griesenbach, U.; Geddes, D. M. und Alton, E. W. (2004): Gene therapy for cystic fibrosis: an example for lung gene therapy, *Gene Ther* (Band 11 Suppl 1), Seite S43-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15454956

- [18] Hargest, R.; Eldin, A. und Williamson, R. (1998): Gene therapy for familial adenomatous polyposis. Prolonged expression of the adenomatous polyposis coli gene after lipofection into mouse colon in vivo, *Adv Exp Med Biol* (Band 451), Seite 385-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10026901
- [19] Ono, M.; Sawa, Y.; Matsumoto, K.; Nakamura, T.; Kaneda, Y. und Matsuda, H. (2002): In vivo gene transfection with hepatocyte growth factor via the pulmonary artery induces angiogenesis in the rat lung, *Circulation* (Band 106), Nr. 12 Suppl 1, Seite I264-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12354744
- [20] Nabel, G. J.; Nabel, E. G.; Yang, Z. Y.; Fox, B. A.; Plautz, G. E.; Gao, X.; Huang, L.; Shu, S.; Gordon, D. und Chang, A. E. (1993): Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 90), Nr. 23, Seite 11307-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8248244
- [21] Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M. und Danielsen, M. (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 84), Nr. 21, Seite 7413-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2823261
- [22] Graham, F. L. und van der Eb, A. J. (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA, *Virology* (Band 52), Nr. 2, Seite 456-67. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4705382
- [23] Chen, C. A. und Okayama, H. (1988): Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA, *Biotechniques* (Band 6), Nr. 7, Seite 632-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3273409
- [24] Mintzer, M. A. und Simanek, E. E. (2009): Nonviral vectors for gene delivery, *Chem Rev* (Band 109), Nr. 2, Seite 259-302. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19053809
- [25] Filion, Mario C. und Phillips, Nigel C. (1998): Major limitations in the use of cationic liposomes for DNA delivery, *International Journal of Pharmaceutics* (Band 162), Nr. 1-2, Seite 159-170. URL:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7W-3SY3G1W-N/2/0b8db8ba1acbe512cfaebd98ee0d57f9>
- [26] Luo, D. und Saltzman, W. M. (2000): Synthetic DNA delivery systems, *Nat Biotechnol* (Band 18), Nr. 1, Seite 33-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10625387

- [27] Zuidam, N. J. und Barenholz, Y. (1998): Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery, *Biochim Biophys Acta* (Band 1368), Nr. 1, Seite 115-28. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9459590
- [28] Zuhorn, I. S.; Bakowsky, U.; Polushkin, E.; Visser, W. H.; Stuart, M. C.; Engberts, J. B. und Hoekstra, D. (2005): Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency, *Mol Ther* (Band 11), Nr. 5, Seite 801-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15851018
- [29] Balazs, Daniel A. und Godbey, WT. (2010): Liposomes for Use in Gene Delivery, *Journal of Drug Delivery* (Band 2011). URL: <http://www.hindawi.com/journals/jdd/2011/326497.html>
- [30] Laemmli, U. K. (1975): Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 72), Nr. 11, Seite 4288-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1060108
- [31] Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B. und Behr, J. P. (1995): A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 16, Seite 7297-301. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7638184
- [32] Bikram, M.; Lee, M.; Chang, C. W.; Janat-Amsbury, M. M.; Kern, S. E. und Kim, S. W. (2005): Long-circulating DNA-complexed biodegradable multiblock copolymers for gene delivery: degradation profiles and evidence of dysopsonization, *J Control Release* (Band 103), Nr. 1, Seite 221-33. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15710513
- [33] Akinc, A.; Thomas, M.; Klibanov, A. M. und Langer, R. (2005): Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis, *J Gene Med* (Band 7), Nr. 5, Seite 657-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15543529
- [34] Haensler, J. und Szoka, F. C., Jr. (1993): Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture, *Bioconjug Chem* (Band 4), Nr. 5, Seite 372-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8274523
- [35] Bielinska, A. U.; Kukowska-Latallo, J. F. und Baker, J. R., Jr. (1997): The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA, *Biochim Biophys Acta* (Band 1353), Nr. 2, Seite 180-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9294012

- [36] Zhang, Z. Y. und Smith, B. D. (2000): High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model, *Bioconjug Chem* (Band 11), Nr. 6, Seite 805-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11087328
- [37] Kim, T. I.; Seo, H. J.; Choi, J. S.; Jang, H. S.; Baek, J. U.; Kim, K. und Park, J. S. (2004): PAMAM-PEG-PAMAM: novel triblock copolymer as a biocompatible and efficient gene delivery carrier, *Biomacromolecules* (Band 5), Nr. 6, Seite 2487-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15530067
- [38] Tang, M. X.; Redemann, C. T. und Szoka, F. C., Jr. (1996): In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers, *Bioconjug Chem* (Band 7), Nr. 6, Seite 703-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8950489
- [39] Kono, K.; Akiyama, H.; Takahashi, T.; Takagishi, T. und Harada, A. (2005): Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery, *Bioconjug Chem* (Band 16), Nr. 1, Seite 208-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15656593
- [40] Kihara, F.; Arima, H.; Tsutsumi, T.; Hirayama, F. und Uekama, K. (2003): In vitro and in vivo gene transfer by an optimized alpha-cyclodextrin conjugate with polyamidoamine dendrimer, *Bioconjug Chem* (Band 14), Nr. 2, Seite 342-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12643744
- [41] Wood, K. C.; Azarin, S. M.; Arap, W.; Pasqualini, R.; Langer, R. und Hammond, P. T. (2008): Tumor-targeted gene delivery using molecularly engineered hybrid polymers functionalized with a tumor-homing peptide, *Bioconjug Chem* (Band 19), Nr. 2, Seite 403-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18189340
- [42] Gupta, B.; Levchenko, T. S. und Torchilin, V. P. (2005): Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides, *Adv Drug Deliv Rev* (Band 57), Nr. 4, Seite 637-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15722168
- [43] Astriab-Fisher, A.; Sergueev, D. S.; Fisher, M.; Shaw, B. R. und Juliano, R. L. (2000): Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide-oligonucleotide conjugates, *Biochem Pharmacol* (Band 60), Nr. 1, Seite 83-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10807948
- [44] Astriab-Fisher, A.; Sergueev, D.; Fisher, M.; Shaw, B. R. und Juliano, R. L. (2002): Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions, *Pharm Res* (Band 19), Nr. 6, Seite 744-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12134943

- [45] Morris, M. C.; Chaloin, L.; Mery, J.; Heitz, F. und Divita, G. (1999): A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier, *Nucleic Acids Res* (Band 27), Nr. 17, Seite 3510-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10446241
- [46] Pooga, M.; Hallbrink, M.; Zorko, M. und Langel, U. (1998): Cell penetration by transportan, *FASEB J* (Band 12), Nr. 1, Seite 67-77. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9438412
- [47] Kawakami, S.; Higuchi, Y. und Hashida, M. (2008): Nonviral approaches for targeted delivery of plasmid DNA and oligonucleotide, *J Pharm Sci* (Band 97), Nr. 2, Seite 726-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17823947
- [48] Ghosh, P. M.; Keese, C. R. und Giaever, I. (1993): Monitoring electroporation in the plasma membrane of adherent mammalian cells, *Biophys J* (Band 64), Nr. 5, Seite 1602-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8324195
- [49] Zhang, G.; Gao, X.; Song, Y. K.; Vollmer, R.; Stolz, D. B.; Gasiorowski, J. Z.; Dean, D. A. und Liu, D. (2004): Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery, *Gene Ther* (Band 11), Nr. 8, Seite 675-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14724673
- [50] Wolff, J. A. und Budker, V. (2005): The mechanism of naked DNA uptake and expression, *Adv Genet* (Band 54), Seite 3-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16096005
- [51] Lechardeur, D.; Verkman, A. S. und Lukacs, G. L. (2005): Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer, *Adv Drug Deliv Rev* (Band 57), Nr. 5, Seite 755-67. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15757759
- [52] Escoffre, J. M.; Portet, T.; Wasungu, L.; Teissie, J.; Dean, D. und Rols, M. P. (2009): What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues, *Mol Biotechnol* (Band 41), Nr. 3, Seite 286-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19016008
- [53] Lukacs, G. L.; Haggie, P.; Seksek, O.; Lechardeur, D.; Freedman, N. und Verkman, A. S. (2000): Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 3, Seite 1625-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10636854
- [54] Lechardeur, D. und Lukacs, G. L. (2006): Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus, *Hum Gene Ther* (Band 17), Nr. 9, Seite 882-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16972756

- [55] Salman, H.; Zbaida, D.; Rabin, Y.; Chatenay, D. und Elbaum, M. (2001): Kinetics and mechanism of DNA uptake into the cell nucleus, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 13, Seite 7247-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11390964
- [56] Vacik, J.; Dean, B. S.; Zimmer, W. E. und Dean, D. A. (1999): Cell-specific nuclear import of plasmid DNA, *Gene Ther* (Band 6), Nr. 6, Seite 1006-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10455402
- [57] Kanazawa, T.; Takashima, Y.; Murakoshi, M.; Nakai, Y. und Okada, H. (2009): Enhancement of gene transfection into human dendritic cells using cationic PLGA nanospheres with a synthesized nuclear localization signal, *Int J Pharm* (Band 379), Nr. 1, Seite 187-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19555751
- [58] Budker, V.; Zhang, G.; Danko, I.; Williams, P. und Wolff, J. (1998): The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle, *Gene Ther* (Band 5), Nr. 2, Seite 272-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9578848
- [59] Liu, F.; Song, Y. und Liu, D. (1999): Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA, *Gene Ther* (Band 6), Nr. 7, Seite 1258-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10455434
- [60] Zhang, G.; Budker, V. und Wolff, J. A. (1999): High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA, *Hum Gene Ther* (Band 10), Nr. 10, Seite 1735-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10428218
- [61] Suda, T. und Liu, D. (2007): Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications, *Mol Ther* (Band 15), Nr. 12, Seite 2063-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17912237
- [62] Herweijer, H. und Wolff, J. A. (2007): Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery, *Gene Ther* (Band 14), Nr. 2, Seite 99-107. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17167496
- [63] Romoren, K.; Thu, B. J. und Evensen, O. (2004): Expression of luciferase in selected organs following delivery of naked and formulated DNA to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by different routes of administration, *Fish Shellfish Immunol* (Band 16), Nr. 2, Seite 251-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15123328
- [64] Liang, K. W.; Nishikawa, M.; Liu, F.; Sun, B.; Ye, Q. und Huang, L. (2004): Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA, *Gene Ther* (Band 11), Nr. 11, Seite 901-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14985786

- [65] Sawyer, G. J.; Grehan, A.; Dong, X.; Whitehorne, M.; Seddon, M.; Shah, A. M.; Zhang, X.; Salehi, S. und Fabre, J. W. (2008): Low-volume hydrodynamic gene delivery to the rat liver via an isolated segment of the inferior vena cava: efficiency, cardiovascular response and intrahepatic vascular dynamics, *J Gene Med* (Band 10), Nr. 5, Seite 540-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18307279
- [66] Kamimura, K.; Suda, T.; Xu, W.; Zhang, G. und Liu, D. (2009): Image-guided, lobe-specific hydrodynamic gene delivery to swine liver, *Mol Ther* (Band 17), Nr. 3, Seite 491-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19156134
- [67] Zhang, G.; Budker, V.; Williams, P.; Subbotin, V. und Wolff, J. A. (2001): Efficient expression of naked dna delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates, *Hum Gene Ther* (Band 12), Nr. 4, Seite 427-38. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11242534
- [68] Wells, D. J. (2004): Opening the floodgates: clinically applicable hydrodynamic delivery of plasmid DNA to skeletal muscle, *Mol Ther* (Band 10), Nr. 2, Seite 207-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15294166
- [69] Zhang, X.; Dong, X.; Sawyer, G. J.; Collins, L. und Fabre, J. W. (2004): Regional hydrodynamic gene delivery to the rat liver with physiological volumes of DNA solution, *J Gene Med* (Band 6), Nr. 6, Seite 693-703. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15170740
- [70] Eastman, S. J.; Baskin, K. M.; Hodges, B. L.; Chu, Q.; Gates, A.; Dreusicke, R.; Anderson, S. und Scheule, R. K. (2002): Development of catheter-based procedures for transducing the isolated rabbit liver with plasmid DNA, *Hum Gene Ther* (Band 13), Nr. 17, Seite 2065-77. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12490001
- [71] Alino, S. F.; Herrero, M. J.; Noguera, I.; Dasi, F. und Sanchez, M. (2007): Pig liver gene therapy by noninvasive interventionist catheterism, *Gene Ther* (Band 14), Nr. 4, Seite 334-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17036058
- [72] Suda, T.; Suda, K. und Liu, D. (2008): Computer-assisted hydrodynamic gene delivery, *Mol Ther* (Band 16), Nr. 6, Seite 1098-104. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18398428
- [73] Nagy, AH. (2006): Clinical Study with Hydrodynamic Gene Delivery into Hepatocytes in Humans, 9th Annual Meeting of American Society Gene Therapy, Baltimore, MD.
- [74] Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y. und Hofschneider, P. H. (1982): Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields, *EMBO J* (Band 1), Nr. 7, Seite 841-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6329708

- [75] Muramatsu, T.; Mizutani, Y.; Ohmori, Y. und Okumura, J. (1997): Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 230), Nr. 2, Seite 376-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9016787
- [76] Titomirov, A. V.; Sukharev, S. und Kistanova, E. (1991): In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA, *Biochim Biophys Acta* (Band 1088), Nr. 1, Seite 131-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1703441
- [77] Okino, M. und Mohri, H. (1987): Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors, *Jpn J Cancer Res* (Band 78), Nr. 12, Seite 1319-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2448275
- [78] Belehradek, M.; Domenge, C.; Luboinski, B.; Orlowski, S.; Belehradek, J., Jr. und Mir, L. M. (1993): Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial, *Cancer* (Band 72), Nr. 12, Seite 3694-700. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7504576
- [79] Heller, R. (1995): Treatment of cutaneous nodules using electrochemotherapy, *J Fla Med Assoc* (Band 82), Nr. 2, Seite 147-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7535837
- [80] Hibino, M.; Itoh, H. und Kinoshita, K., Jr. (1993): Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential, *Biophys J* (Band 64), Nr. 6, Seite 1789-800. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8369408
- [81] Rols, M. P. (2008): Mechanism by which electroporation mediates DNA migration and entry into cells and targeted tissues, *Methods Mol Biol* (Band 423), Seite 19-33. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18370188
- [82] Faurie, C.; Golzio, M.; Moller, P.; Teissie, J. und Rols, M. P. (2003): Cell and animal imaging of electrically mediated gene transfer, *DNA Cell Biol* (Band 22), Nr. 12, Seite 777-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14683588
- [83] Gehl, J. (2003): Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research, *Acta Physiol Scand* (Band 177), Nr. 4, Seite 437-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12648161
- [84] Mossop, B. J.; Barr, R. C.; Henshaw, J. W. und Yuan, F. (2007): Electric fields around and within single cells during electroporation-a model study, *Ann Biomed Eng* (Band 35), Nr. 7, Seite 1264-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17340194

- [85] Liu, F.; Heston, S.; Shollenberger, L. M.; Sun, B.; Mickle, M.; Lovell, M. und Huang, L. (2006): Mechanism of in vivo DNA transport into cells by electroporation: electrophoresis across the plasma membrane may not be involved, *J Gene Med* (Band 8), Nr. 3, Seite 353-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16353289
- [86] Dowty, M. E.; Williams, P.; Zhang, G.; Hagstrom, J. E. und Wolff, J. A. (1995): Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 10, Seite 4572-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7753845
- [87] Mesika, A.; Kiss, V.; Brumfeld, V.; Ghosh, G. und Reich, Z. (2005): Enhanced intracellular mobility and nuclear accumulation of DNA plasmids associated with a karyophilic protein, *Hum Gene Ther* (Band 16), Nr. 2, Seite 200-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15761260
- [88] Klein, R. M.; Wolf, E. D.; Wu, R. und Sanford, J. C. (1987): High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells., *Nature* (Band 327), Seite 70-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1422046
- [89] Burkholder, J. K.; Decker, J. und Yang, N. S. (1993): Rapid transgene expression in lymphocyte and macrophage primary cultures after particle bombardment-mediated gene transfer, *J Immunol Methods* (Band 165), Nr. 2, Seite 149-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8228267
- [90] Fynan, E. F.; Webster, R. G.; Fuller, D. H.; Haynes, J. R.; Santoro, J. C. und Robinson, H. L. (1993): DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 90), Nr. 24, Seite 11478-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8265577
- [91] Qiu, P.; Ziegelhoffer, P.; Sun, J. und Yang, N. S. (1996): Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization, *Gene Ther* (Band 3), Nr. 3, Seite 262-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8646558
- [92] Lee, J. Y.; Hirono, I. I. und Aoki, T. (2000): Stable Expression of a Foreign Gene, Delivered by Gene Gun, in the Muscle of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*, *Mar Biotechnol* (NY) (Band 2), Nr. 3, Seite 254-258. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10852804
- [93] Haynes, J. R.; McCabe, D. E.; Swain, W. F.; Widera, G. und Fuller, J. T. (1996): Particle-mediated nucleic acid immunization, *J Biotechnol* (Band 44), Nr. 1-3, Seite 37-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8717384

- [94] Rakhmilevich, A. L.; Turner, J.; Ford, M. J.; McCabe, D.; Sun, W. H.; Sondel, P. M.; Grotz, K. und Yang, N. S. (1996): Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 13, Seite 6291-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8692808
- [95] Mahvi, D. M.; Sondel, P. M.; Yang, N. S.; Albertini, M. R.; Schiller, J. H.; Hank, J.; Heiner, J.; Gan, J.; Swain, W. und Logrono, R. (1997): Phase I/IB study of immunization with autologous tumor cells transfected with the GM-CSF gene by particle-mediated transfer in patients with melanoma or sarcoma, *Hum Gene Ther* (Band 8), Nr. 7, Seite 875-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9143914
- [96] Cassaday, R. D.; Sondel, P. M.; King, D. M.; Macklin, M. D.; Gan, J.; Warner, T. F.; Zuleger, C. L.; Bridges, A. J.; Schalch, H. G.; Kim, K. M.; Hank, J. A.; Mahvi, D. M. und Albertini, M. R. (2007): A phase I study of immunization using particle-mediated epidermal delivery of genes for gp100 and GM-CSF into uninvolved skin of melanoma patients, *Clin Cancer Res* (Band 13), Nr. 2 Pt 1, Seite 540-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17255276
- [97] Aravindaram, K.; Yu, H. H.; Lan, C. W.; Wang, P. H.; Chen, Y. H.; Chen, H. M.; Yagita, H. und Yang, N. S. (2009): Transgenic expression of human gp100 and RANTES at specific time points for suppression of melanoma, *Gene Ther* (Band 16), Nr. 11, Seite 1329-39. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19626052
- [98] Sanford, J. C.; Smith, F. D. und Russell, J. A. (1993): Optimizing the biolistic process for different biological applications, *Methods Enzymol* (Band 217), Seite 483-509. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8474348
- [99] Wu, F.; Wang, Z. B.; Chen, W. Z.; Zhu, H.; Bai, J.; Zou, J. Z.; Li, K. Q.; Jin, C. B.; Xie, F. L. und Su, H. B. (2004): Extracorporeal high intensity focused ultrasound ablation in the treatment of patients with large hepatocellular carcinoma, *Ann Surg Oncol* (Band 11), Nr. 12, Seite 1061-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15545506
- [100] Kim, H. J.; Greenleaf, J. F.; Kinnick, R. R.; Bronk, J. T. und Bolander, M. E. (1996): Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells, *Hum Gene Ther* (Band 7), Nr. 11, Seite 1339-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8818721
- [101] Manome, Y.; Nakamura, M.; Ohno, T. und Furuhashi, H. (2000): Ultrasound facilitates transduction of naked plasmid DNA into colon carcinoma cells in vitro and in vivo, *Hum Gene Ther* (Band 11), Nr. 11, Seite 1521-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10945766

- [102] Feril, L. B., Jr. und Kondo, T. (2005): Major factors involved in the inhibition of ultrasound-induced free radical production and cell killing by pre-sonication incubation or by high cell density, *Ultrason Sonochem* (Band 12), Nr. 5, Seite 353-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15590309
- [103] Yamashita, Y.; Shimada, M.; Tachibana, K.; Harimoto, N.; Tsujita, E.; Shirabe, K.; Miyazaki, J. und Sugimachi, K. (2002): In vivo gene transfer into muscle via electro-sonoporation, *Hum Gene Ther* (Band 13), Nr. 17, Seite 2079-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12490002
- [104] Escoffre, J. M.; Kaddur, K.; Rols, M. P. und Bouakaz, A. (2010): In vitro gene transfer by electrosonoporation, *Ultrasound Med Biol* (Band 36), Nr. 10, Seite 1746-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20850028
- [105] Wu, J.; Chen, D.; Pepe, J.; Himberg, B. E. und Rihn, M. (2006): Application of liposomes to sonoporation, *Ultrasound Med Biol* (Band 32), Nr. 3, Seite 429-37. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16530102
- [106] Larkin, J. O.; Casey, G. D.; Tangney, M.; Cashman, J.; Collins, C. G.; Soden, D. M. und O'Sullivan, G. C. (2008): Effective tumor treatment using optimized ultrasound-mediated delivery of bleomycin, *Ultrasound Med Biol* (Band 34), Nr. 3, Seite 406-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17988788
- [107] Newman, C. M. und Bettinger, T. (2007): Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer, *Gene Ther* (Band 14), Nr. 6, Seite 465-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17339881
- [108] Feril, L. B., Jr.; Tsuda, Y.; Kondo, T.; Zhao, Q. L.; Ogawa, R.; Cui, Z. G.; Tsukada, K. und Riesz, P. (2004): Ultrasound-induced killing of monocytic U937 cells enhanced by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, *Cancer Sci* (Band 95), Nr. 2, Seite 181-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14965370
- [109] Villemejane, J. und Mir, L. M. (2009): Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications, *Br J Pharmacol* (Band 157), Nr. 2, Seite 207-19. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19154421
- [110] Akowuah, E. F.; Gray, C.; Lawrie, A.; Sheridan, P. J.; Su, C. H.; Bettinger, T.; Briskin, A. F.; Gunn, J.; Crossman, D. C.; Francis, S. E.; Baker, A. H. und Newman, C. M. (2005): Ultrasound-mediated delivery of TIMP-3 plasmid DNA into saphenous vein leads to increased lumen size in a porcine interposition graft model, *Gene Ther* (Band 12), Nr. 14, Seite 1154-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15829995

- [111] Klibanov, A. L. (2006): Microbubble contrast agents: targeted ultrasound imaging and ultrasound-assisted drug-delivery applications, *Invest Radiol* (Band 41), Nr. 3, Seite 354-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16481920
- [112] Luo, D. und Saltzman, W. M. (2000): Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface, *Nat Biotechnol* (Band 18), Nr. 8, Seite 893-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10932162
- [113] Walther, W.; Siegel, R.; Kobelt, D.; Knosel, T.; Dietel, M.; Bembenek, A.; Aumann, J.; Schleef, M.; Baier, R.; Stein, U. und Schlag, P. M. (2008): Novel jet-injection technology for nonviral intratumoral gene transfer in patients with melanoma and breast cancer, *Clin Cancer Res* (Band 14), Nr. 22, Seite 7545-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19010873
- [114] Ensenaer, R.; Hartl, D.; Vockley, J.; Roscher, A. und Fuchs, U. (2010): Efficient and gentle siRNA delivery by magnetofection, *Biotech Histochem*. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20297946
- [115] Lubbe, A. S.; Bergemann, C.; Riess, H.; Schriever, F.; Reichardt, P.; Possinger, K.; Matthias, M.; Dorken, B.; Herrmann, F.; Gurtler, R.; Hohenberger, P.; Haas, N.; Sohr, R.; Sander, B.; Lemke, A. J.; Ohlendorf, D.; Huhnt, W. und Huhn, D. (1996): Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors, *Cancer Res* (Band 56), Nr. 20, Seite 4686-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8840985
- [116] Plank, C. und Rosenecker, J. (2009): Magnetofection: the use of magnetic nanoparticles for nucleic acid delivery, *Cold Spring Harb Protoc* (Band 2009), Nr. 6, Seite pdb prot5230. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20147188
- [117] Scherer, F.; Anton, M.; Schillinger, U.; Henke, J.; Bergemann, C.; Kruger, A.; Gansbacher, B. und Plank, C. (2002): Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo, *Gene Ther* (Band 9), Nr. 2, Seite 102-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11857068
- [118] Xenariou, S.; Griesenbach, U.; Ferrari, S.; Dean, P.; Scheule, R. K.; Cheng, S. H.; Geddes, D. M.; Plank, C. und Alton, E. W. (2006): Using magnetic forces to enhance non-viral gene transfer to airway epithelium in vivo, *Gene Ther* (Band 13), Nr. 21, Seite 1545-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16738690
- [119] Weissleder, R.; Stark, D. D.; Engelstad, B. L.; Bacon, B. R.; Compton, C. C.; White, D. L.; Jacobs, P. und Lewis, J. (1989): Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity, *AJR Am J Roentgenol* (Band 152), Nr. 1, Seite 167-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2783272

- [120] Alexiou, C.; Arnold, W.; Klein, R. J.; Parak, F. G.; Hulin, P.; Bergemann, C.; Erhardt, W.; Wagenpfeil, S. und Lubbe, A. S. (2000): Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting, *Cancer Res* (Band 60), Nr. 23, Seite 6641-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11118047
- [121] Rau, J. L. (2005): The inhalation of drugs: advantages and problems, *Respir Care* (Band 50), Nr. 3, Seite 367-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15737247
- [122] Rubin, B. K. (2010): Air and soul: the science and application of aerosol therapy, *Respir Care* (Band 55), Nr. 7, Seite 911-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20587104
- [123] Gautam, A.; Waldrep, J. C. und Densmore, C. L. (2003): Aerosol gene therapy, *Mol Biotechnol* (Band 23), Nr. 1, Seite 51-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12611269
- [124] Canonico, A. E.; Plitman, J. D.; Conary, J. T.; Meyrick, B. O. und Brigham, K. L. (1994): No lung toxicity after repeated aerosol or intravenous delivery of plasmid-cationic liposome complexes, *J Appl Physiol* (Band 77), Nr. 1, Seite 415-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7961263
- [125] Stribling, R.; Brunette, E.; Liggitt, D.; Gaensler, K. und Debs, R. (1992): Aerosol gene delivery in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 23, Seite 11277-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1454808
- [126] Gonda, I. (1992): The use of aerosol medication in respiratory disease, *Aust Fam Physician* (Band 21), Nr. 5, Seite 575-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1520126
- [127] Koshkina, N. V.; Knight, V.; Gilbert, B. E.; Golunski, E.; Roberts, L. und Waldrep, J. C. (2001): Improved respiratory delivery of the anticancer drugs, camptothecin and paclitaxel, with 5% CO₂-enriched air: pharmacokinetic studies, *Cancer Chemother Pharmacol* (Band 47), Nr. 5, Seite 451-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11391862
- [128] Lee, E. R.; Marshall, J.; Siegel, C. S.; Jiang, C.; Yew, N. S.; Nichols, M. R.; Nietupski, J. B.; Ziegler, R. J.; Lane, M. B.; Wang, K. X.; Wan, N. C.; Scheule, R. K.; Harris, D. J.; Smith, A. E. und Cheng, S. H. (1996): Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung, *Hum Gene Ther* (Band 7), Nr. 14, Seite 1701-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8886841

- [129] Lerondel, S.; Vecellio None, L.; Faure, L.; Sizaret, P. Y.; Sene, C.; Pavirani, A.; Diot, P. und Le Pape, A. (2001): Gene therapy for cystic fibrosis with aerosolized adenovirus-CFTR: characterization of the aerosol and scintigraphic determination of lung deposition in baboons, *J Aerosol Med* (Band 14), Nr. 1, Seite 95-105. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11495490
- [130] Moss, R. B.; Rodman, D.; Spencer, L. T.; Aitken, M. L.; Zeitlin, P. L.; Waltz, D.; Milla, C.; Brody, A. S.; Clancy, J. P.; Ramsey, B.; Hamblett, N. und Heald, A. E. (2004): Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial, *Chest* (Band 125), Nr. 2, Seite 509-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14769732
- [131] Bellon, G.; Michel-Calemard, L.; Thouvenot, D.; Jagneaux, V.; Poitevin, F.; Malcus, C.; Accart, N.; Layani, M. P.; Aymard, M.; Bernon, H.; Bienvenu, J.; Courtney, M.; Doring, G.; Gilly, B.; Gilly, R.; Lamy, D.; Levrey, H.; Morel, Y.; Paulin, C.; Perraud, F.; Rodillon, L.; Sene, C.; So, S.; Touraine-Moulin, F.; Pavirani, A. und et al. (1997): Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial, *Hum Gene Ther* (Band 8), Nr. 1, Seite 15-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8989991
- [132] Chadwick, S. L.; Kingston, H. D.; Stern, M.; Cook, R. M.; O'Connor, B. J.; Lukasson, M.; Balfour, R. P.; Rosenberg, M.; Cheng, S. H.; Smith, A. E.; Meeker, D. P.; Geddes, D. M. und Alton, E. W. (1997): Safety of a single aerosol administration of escalating doses of the cationic lipid GL-67/DOPE/DMPE-PEG5000 formulation to the lungs of normal volunteers, *Gene Ther* (Band 4), Nr. 9, Seite 937-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9349430
- [133] Alton, E. W.; Stern, M.; Farley, R.; Jaffe, A.; Chadwick, S. L.; Phillips, J.; Davies, J.; Smith, S. N.; Browning, J.; Davies, M. G.; Hodson, M. E.; Durham, S. R.; Li, D.; Jeffery, P. K.; Scallan, M.; Balfour, R.; Eastman, S. J.; Cheng, S. H.; Smith, A. E.; Meeker, D. und Geddes, D. M. (1999): Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial, *Lancet* (Band 353), Nr. 9157, Seite 947-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10459902
- [134] Sikes, M. L.; O'Malley, B. W., Jr.; Finegold, M. J. und Ledley, F. D. (1994): In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection, *Hum Gene Ther* (Band 5), Nr. 7, Seite 837-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7981308
- [135] Wolff, J. A.; Malone, R. W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A. und Felgner, P. L. (1990): Direct gene transfer into mouse muscle in vivo, *Science* (Band 247), Nr. 4949 Pt 1, Seite 1465-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1690918

- [136] Baban, D. F. und Seymour, L. W. (1998): Control of tumour vascular permeability, *Adv Drug Deliv Rev* (Band 34), Nr. 1, Seite 109-119. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10837673
- [137] Walther, W.; Minow, T.; Martin, R.; Fichtner, I.; Schlag, P. M. und Stein, U. (2006): Uptake, biodistribution, and time course of naked plasmid DNA trafficking after intratumoral in vivo jet injection, *Hum Gene Ther* (Band 17), Nr. 6, Seite 611-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16776570
- [138] Mumper, R. J. und Cui, Z. (2003): Genetic immunization by jet injection of targeted pDNA-coated nanoparticles, *Methods* (Band 31), Nr. 3, Seite 255-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14511958
- [139] Yang, N. S.; Burkholder, J.; Roberts, B.; Martinell, B. und McCabe, D. (1990): In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 87), Nr. 24, Seite 9568-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2175906
- [140] Williams, R. S.; Johnston, S. A.; Riedy, M.; DeVit, M. J.; McElligott, S. G. und Sanford, J. C. (1991): Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 88), Nr. 7, Seite 2726-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2011582
- [141] Ren, S.; Li, M.; Smith, J. M.; DeTolla, L. J. und Furth, P. A. (2002): Low-volume jet injection for intradermal immunization in rabbits, *BMC Biotechnol* (Band 2), Seite 10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12028591
- [142] Furth, P. A.; Kerr, D. und Wall, R. (1995): Gene transfer by jet injection into differentiated tissues of living animals and in organ culture, *Mol Biotechnol* (Band 4), Nr. 2, Seite 121-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8556427
- [143] Walther, W.; Stein, U.; Fichtner, I.; Malcherek, L.; Lemm, M. und Schlag, P. M. (2001): Nonviral in vivo gene delivery into tumors using a novel low volume jet-injection technology, *Gene Ther* (Band 8), Nr. 3, Seite 173-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11313788
- [144] Mitragotri, S. (2006): Current status and future prospects of needle-free liquid jet injectors, *Nat Rev Drug Discov* (Band 5), Nr. 7, Seite 543-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16816837
- [145] Walther, W.; Fichtner, I.; Schlag, P. M. und Stein, U. S. (2009): Nonviral jet-injection technology for intratumoral in vivo gene transfer of naked DNA, *Methods Mol Biol* (Band 542), Seite 195-208. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19565904

- [146] Babiuk, S.; Baca-Estrada, M. E.; Foldvari, M.; Baizer, L.; Stout, R.; Storms, M.; Rabussay, D.; Widera, G. und Babiuk, L. (2003): Needle-free topical electroporation improves gene expression from plasmids administered in porcine skin, *Mol Ther* (Band 8), Nr. 6, Seite 992-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14664802
- [147] Jechlinger, W. (2006): Optimization and delivery of plasmid DNA for vaccination, *Expert Rev Vaccines* (Band 5), Nr. 6, Seite 803-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17184219
- [148] Valera, A.; Perales, J. C.; Hatzoglou, M. und Bosch, F. (1994): Expression of the neomycin-resistance (neo) gene induces alterations in gene expression and metabolism, *Hum Gene Ther* (Band 5), Nr. 4, Seite 449-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7914094
- [149] Sato, Y.; Roman, M.; Tighe, H.; Lee, D.; Corr, M.; Nguyen, M. D.; Silverman, G. J.; Lotz, M.; Carson, D. A. und Raz, E. (1996): Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization, *Science* (Band 273), Nr. 5273, Seite 352-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8662521
- [150] Tolmachov, O. (2009): Designing plasmid vectors, *Methods Mol Biol* (Band 542), Seite 117-29. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19565899
- [151] Choy, H. E. und Adhya, S. (1993): RNA polymerase idling and clearance in gal promoters: use of supercoiled minicircle DNA template made in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 90), Nr. 2, Seite 472-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8380640
- [152] Darquet, A. M.; Cameron, B.; Wils, P.; Scherman, D. und Crouzet, J. (1997): A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle, *Gene Ther* (Band 4), Nr. 12, Seite 1341-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9472558
- [153] Mayrhofer, P.; Schleef, M. und Jechlinger, W. (2009): Use of minicircle plasmids for gene therapy, *Methods Mol Biol* (Band 542), Seite 87-104. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19565897
- [154] Bigger, B. W.; Tolmachov, O.; Collombet, J. M.; Fragkos, M.; Palaszewski, I. und Coutelle, C. (2001): An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 25, Seite 23018-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11304530
- [155] Thorpe, H. M. und Smith, M. C. (1998): In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 10, Seite 5505-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9576912

- [156] Jechlinger, W.; Azimpour Tabrizi, C.; Lubitz, W. und Mayrhofer, P. (2004): Minicircle DNA immobilized in bacterial ghosts: in vivo production of safe non-viral DNA delivery vehicles, *J Mol Microbiol Biotechnol* (Band 8), Nr. 4, Seite 222-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16179799
- [157] Darquet, A. M.; Rangara, R.; Kreiss, P.; Schwartz, B.; Naimi, S.; Delaere, P.; Crouzet, J. und Scherman, D. (1999): Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer, *Gene Ther* (Band 6), Nr. 2, Seite 209-18. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10435105
- [158] Wu, J.; Xiao, X.; Zhao, P.; Xue, G.; Zhu, Y.; Zhu, X.; Zheng, L.; Zeng, Y. und Huang, W. (2006): Minicircle-IFN γ induces antiproliferative and antitumoral effects in human nasopharyngeal carcinoma, *Clin Cancer Res* (Band 12), Nr. 15, Seite 4702-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16899621
- [159] Broll, S.; Oumard, A.; Hahn, K.; Schambach, A. und Bode, J. (2010): Minicircle performance depending on S/MAR-nuclear matrix interactions, *J Mol Biol* (Band 395), Nr. 5, Seite 950-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20004666
- [160] Schaarschmidt, D.; Baltin, J.; Stehle, I. M.; Lipps, H. J. und Knippers, R. (2004): An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex, *EMBO J* (Band 23), Nr. 1, Seite 191-201. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14685267
- [161] Kochling, J.; Prada, J.; Bahrami, M.; Stripecke, R.; Seeger, K.; Henze, G.; Wittig, B. und Schmidt, M. (2008): Anti-tumor effect of DNA-based vaccination and dSLIM immunomodulatory molecules in mice with Ph⁺ acute lymphoblastic leukaemia, *Vaccine* (Band 26), Nr. 36, Seite 4669-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18639600
- [162] Schakowski, F.; Gorschluter, M.; Junghans, C.; Schroff, M.; Buttgereit, P.; Ziske, C.; Schottker, B.; Konig-Merediz, S. A.; Sauerbruch, T.; Wittig, B. und Schmidt-Wolf, I. G. (2001): A novel minimal-size vector (MIDGE) improves transgene expression in colon carcinoma cells and avoids transfection of undesired DNA, *Mol Ther* (Band 3), Nr. 5 Pt 1, Seite 793-800. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11356084
- [163] Machelska, H.; Schroff, M.; Oswald, D.; Binder, W.; Sitte, N.; Mousa, S. A.; Rittner, H. L.; Brack, A.; Labuz, D.; Busch, M.; Wittig, B.; Schafer, M. und Stein, C. (2009): Peripheral non-viral MIDGE vector-driven delivery of beta-endorphin in inflammatory pain, *Mol Pain* (Band 5), Seite 72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20003437
- [164] Zhang, E. P.; Franke, J.; Schroff, M.; Junghans, C.; Wittig, B. und Hoffmann, F. (2003): Ballistic CTLA4 and IL-4 gene transfer into the lower lid prolongs orthotopic corneal graft survival in mice, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (Band 241), Nr. 11, Seite 921-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14566570

- [165] Boretto, F. S.; Leutenegger, C. M.; Mislin, C.; Hofmann-Lehmann, R.; König, S.; Schroff, M.; Junghans, C.; Fehr, D.; Huettner, S. W.; Habel, A.; Flynn, J. N.; Aubert, A.; Pedersen, N. C.; Wittig, B. und Lutz, H. (2000): Protection against FIV challenge infection by genetic vaccination using minimalistic DNA constructs for FIV env gene and feline IL-12 expression, *AIDS* (Band 14), Nr. 12, Seite 1749-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10985311
- [166] Wittig, B.; Marten, A.; Dorbic, T.; Weineck, S.; Min, H.; Niemitz, S.; Trojanek, B.; Flieger, D.; Kruopis, S.; Albers, A.; Löffel, J.; Neubauer, A.; Albers, P.; Müller, S.; Sauerbruch, T.; Bieber, T.; Huhn, D. und Schmidt-Wolf, I. G. (2001): Therapeutic vaccination against metastatic carcinoma by expression-modulated and immunomodified autologous tumor cells: a first clinical phase I/II trial, *Hum Gene Ther* (Band 12), Nr. 3, Seite 267-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11177563
- [167] Ivics, Z.; Hackett, P. B.; Plasterk, R. H. und Izsvak, Z. (1997): Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells, *Cell* (Band 91), Nr. 4, Seite 501-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9390559
- [168] Miskey, C.; Izsvak, Z.; Plasterk, R. H. und Ivics, Z. (2003): The Frog Prince: a reconstructed transposon from *Rana pipiens* with high transpositional activity in vertebrate cells, *Nucleic Acids Res* (Band 31), Nr. 23, Seite 6873-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14627820
- [169] Ivics, Z. und Izsvak, Z. (2006): Transposons for gene therapy!, *Curr Gene Ther* (Band 6), Nr. 5, Seite 593-607. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17073604
- [170] Wilson, M. H.; Coates, C. J. und George, A. L., Jr. (2007): PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells, *Mol Ther* (Band 15), Nr. 1, Seite 139-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17164785
- [171] Balciunas, D.; Wangensteen, K. J.; Wilber, A.; Bell, J.; Geurts, A.; Sivasubbu, S.; Wang, X.; Hackett, P. B.; Largaespada, D. A.; McIvor, R. S. und Ekker, S. C. (2006): Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates, *PLoS Genet* (Band 2), Nr. 11, Seite e169. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17096595
- [172] Yant, S. R.; Wu, X.; Huang, Y.; Garrison, B.; Burgess, S. M. und Kay, M. A. (2005): High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals, *Mol Cell Biol* (Band 25), Nr. 6, Seite 2085-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15743807
- [173] Scherdin, U.; Rhodes, K. und Breindl, M. (1990): Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration, *J Virol* (Band 64), Nr. 2, Seite 907-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2296087

- [174] Meekings, K. N.; Leipzig, J.; Bushman, F. D.; Taylor, G. P. und Bangham, C. R. (2008): HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP, PLoS Pathog (Band 4), Nr. 3, Seite e1000027. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18369476
- [175] Yant, S. R.; Huang, Y.; Akache, B. und Kay, M. A. (2007): Site-directed transposon integration in human cells, Nucleic Acids Res (Band 35), Nr. 7, Seite e50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17344320
- [176] Ohlfest, J. R.; Ivics, Z. und Izsvak, Z. (2009): Transposable elements as plasmid-based vectors for long-term gene transfer into tumors, Methods Mol Biol (Band 542), Seite 105-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19565898
- [177] Hackett, P. B.; Largaespada, D. A. und Cooper, L. J. (2010): A transposon and transposase system for human application, Mol Ther (Band 18), Nr. 4, Seite 674-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20104209
- [178] Aggarwal, B. B. (2003): Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword, Nat Rev Immunol (Band 3), Nr. 9, Seite 745-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12949498
- [179] Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N. und Williamson, B. (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 72), Nr. 9, Seite 3666-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1103152
- [180] Hehlhans, T. und Pfeffer, K. (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games, Immunology (Band 115), Nr. 1, Seite 1-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15819693
- [181] Aggarwal, B. B.; Kohr, W. J.; Hass, P. E.; Moffat, B.; Spencer, S. A.; Henzel, W. J.; Bringman, T. S.; Nedwin, G. E.; Goeddel, D. V. und Harkins, R. N. (1985): Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization, J Biol Chem (Band 260), Nr. 4, Seite 2345-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3871770
- [182] Bazzoni, F. und Beutler, B. (1996): The tumor necrosis factor ligand and receptor families, N Engl J Med (Band 334), Nr. 26, Seite 1717-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8637518
- [183] Campbell, I. K.; Roberts, L. J. und Wicks, I. P. (2003): Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor and rheumatoid arthritis, Immunol Cell Biol (Band 81), Nr. 5, Seite 354-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12969323

- [184] Chan, K. F.; Siegel, M. R. und Lenardo, J. M. (2000): Signaling by the TNF receptor superfamily and T cell homeostasis, *Immunity* (Band 13), Nr. 4, Seite 419-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11070160
- [185] Feinberg, B.; Kurzrock, R.; Talpaz, M.; Blick, M.; Saks, S. und Gutterman, J. U. (1988): A phase I trial of intravenously-administered recombinant tumor necrosis factor-alpha in cancer patients, *J Clin Oncol* (Band 6), Nr. 8, Seite 1328-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3411344
- [186] Lejeune, F.; Lienard, D.; Eggermont, A.; Schraffordt Koops, H.; Rosenkaimer, F.; Gerain, J.; Klaase, J.; Kroon, B.; Vanderveken, J. und Schmitz, P. (1994): Rationale for using TNF alpha and chemotherapy in regional therapy of melanoma, *J Cell Biochem* (Band 56), Nr. 1, Seite 52-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7806592
- [187] Pace, M.; Gattai, R.; Mascitelli, E. M. und Millanta, L. (2011): Results of isolated lower limb perfusion for loco-regional advanced/recurrent melanoma using borderline true hyperthermia plus additional bolus of melphalan. A critical analysis of homogeneous cases, *J Surg Oncol*. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21721008
- [188] Eggermont, A. M.; de Wilt, J. H. und ten Hagen, T. L. (2003): Current uses of isolated limb perfusion in the clinic and a model system for new strategies, *Lancet Oncol* (Band 4), Nr. 7, Seite 429-37. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12850194
- [189] Deroose, J. P.; Eggermont, A. M.; van Geel, A. N.; de Wilt, J. H.; Burger, J. W. und Verhoef, C. (2011): 20 Years Experience of TNF-Based Isolated Limb Perfusion for In-Transit Melanoma Metastases: TNF Dose Matters, *Ann Surg Oncol*. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21879272
- [190] Moore, R. J.; Owens, D. M.; Stamp, G.; Arnott, C.; Burke, F.; East, N.; Holdsworth, H.; Turner, L.; Rollins, B.; Pasparakis, M.; Kollias, G. und Balkwill, F. (1999): Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis, *Nat Med* (Band 5), Nr. 7, Seite 828-31. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10395330
- [191] Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* (Band 26), Nr. 4, Seite 239-57. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4561027
- [192] Elmore, S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol Pathol* (Band 35), Nr. 4, Seite 495-516. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17562483

- [193] Thorburn, A. (2004): Death receptor-induced cell killing, *Cell Signal* (Band 16), Nr. 2, Seite 139-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14636884
- [194] Pennarun, B.; Meijer, A.; de Vries, E. G.; Kleibeuker, J. H.; Kruyt, F. und de Jong, S. (2010): Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer, *Biochim Biophys Acta* (Band 1805), Nr. 2, Seite 123-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19961901
- [195] Kischkel, F. C.; Hellbardt, S.; Behrmann, I.; Germer, M.; Pawlita, M.; Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor, *EMBO J* (Band 14), Nr. 22, Seite 5579-88. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8521815
- [196] Longley, D. B.; Wilson, T. R.; McEwan, M.; Allen, W. L.; McDermott, U.; Galligan, L. und Johnston, P. G. (2006): c-FLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death, *Oncogene* (Band 25), Nr. 6, Seite 838-48. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16247474
- [197] Riedl, S. J. und Salvesen, G. S. (2007): The apoptosome: signalling platform of cell death, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 8), Nr. 5, Seite 405-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17377525
- [198] Shiozaki, E. N. und Shi, Y. (2004): Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology, *Trends Biochem Sci* (Band 29), Nr. 9, Seite 486-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15337122
- [199] Ola, M. S.; Nawaz, M. und Ahsan, H. (2011): Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis, *Mol Cell Biochem* (Band 351), Nr. 1-2, Seite 41-58. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21210296
- [200] Schuler, M. und Green, D. R. (2001): Mechanisms of p53-dependent apoptosis, *Biochem Soc Trans* (Band 29), Nr. Pt 6, Seite 684-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11709054
- [201] Trapani, J. A. und Smyth, M. J. (2002): Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway, *Nat Rev Immunol* (Band 2), Nr. 10, Seite 735-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12360212
- [202] Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A. und Nagata, S. (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature* (Band 391), Nr. 6662, Seite 43-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9422506

- [203] Sakahira, H.; Enari, M. und Nagata, S. (1998): Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature* (Band 391), Nr. 6662, Seite 96-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9422513
- [204] Everett, H.; Barry, M.; Sun, X.; Lee, S. F.; Frantz, C.; Berthiaume, L. G.; McFadden, G. und Bleackley, R. C. (2002): The myxoma poxvirus protein, M11L, prevents apoptosis by direct interaction with the mitochondrial permeability transition pore, *J Exp Med* (Band 196), Nr. 9, Seite 1127-39. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12417624
- [205] Goping, I. S.; Barry, M.; Liston, P.; Sawchuk, T.; Constantinescu, G.; Michalak, K. M.; Shostak, I.; Roberts, D. L.; Hunter, A. M.; Korneluk, R. und Bleackley, R. C. (2003): Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition, *Immunity* (Band 18), Nr. 3, Seite 355-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12648453
- [206] Slee, E. A.; Adrain, C. und Martin, S. J. (2001): Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 10, Seite 7320-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11058599
- [207] Kothakota, S.; Azuma, T.; Reinhard, C.; Klippel, A.; Tang, J.; Chu, K.; McGarry, T. J.; Kirschner, M. W.; Kohts, K.; Kwiatkowski, D. J. und Williams, L. T. (1997): Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis, *Science* (Band 278), Nr. 5336, Seite 294-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9323209
- [208] Bratton, D. L.; Fadok, V. A.; Richter, D. A.; Kailey, J. M.; Guthrie, L. A. und Henson, P. M. (1997): Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 42, Seite 26159-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9334182
- [209] Daleke, D. L. (2003): Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry, *J Lipid Res* (Band 44), Nr. 2, Seite 233-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12576505
- [210] Zeiss, C. J. (2003): The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice, *Vet Pathol* (Band 40), Nr. 5, Seite 481-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12949404
- [211] Butkus, V.; Bitinaite, J.; Kersulyte, D. und Janulaitis, A. (1985): A new restriction endonuclease Eco31I recognizing a non-palindromic sequence, *Biochim Biophys Acta* (Band 826), Nr. 4, Seite 208-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3000450

- [212] Lindl, T (2002): Zell- und Gewebekultur 5. Auflage, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg; Berlin.
- [213] Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem* (Band 162), Nr. 1, Seite 156-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2440339
- [214] Chomczynski, P. und Sacchi, N. (2006): The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on, *Nat Protoc* (Band 1), Nr. 2, Seite 581-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17406285
- [215] Hou, Y.; Zhang, H.; Miranda, L. und Lin, S. (2010): Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: microalgal pcna as the model gene, *PLoS One* (Band 5), Nr. 3, Seite e9545. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20221433
- [216] Yates, J. W.; Chalmer, B. und McKegney, F. P. (1980): Evaluation of patients with advanced cancer using the Karnofsky performance status, *Cancer* (Band 45), Nr. 8, Seite 2220-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7370963
- [217] Glover, D. J.; Lipps, H. J. und Jans, D. A. (2005): Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans, *Nat Rev Genet* (Band 6), Nr. 4, Seite 299-310. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15761468
- [218] Shi, F.; Rakhmievich, A. L.; Heise, C. P.; Oshikawa, K.; Sondel, P. M.; Yang, N. S. und Mahvi, D. M. (2002): Intratumoral injection of interleukin-12 plasmid DNA, either naked or in complex with cationic lipid, results in similar tumor regression in a murine model, *Mol Cancer Ther* (Band 1), Nr. 11, Seite 949-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12481417
- [219] Sudowe, S.; Dominitzki, S.; Montermann, E.; Bros, M.; Grabbe, S. und Reske-Kunz, A. B. (2009): Uptake and presentation of exogenous antigen and presentation of endogenously produced antigen by skin dendritic cells represent equivalent pathways for the priming of cellular immune responses following biolistic DNA immunization, *Immunology* (Band 128), Nr. 1 Suppl, Seite e193-205. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18800984
- [220] Heinzerling, L.; Burg, G.; Dummer, R.; Maier, T.; Oberholzer, P. A.; Schultz, J.; Elzaouk, L.; Pavlovic, J. und Moelling, K. (2005): Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin 12 into patients with metastatic melanoma: clinical efficacy, *Hum Gene Ther* (Band 16), Nr. 1, Seite 35-48. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15703487

- [221] Heilmann, C. A.; Attmann, T.; Thiem, A.; Haffner, E.; Beyersdorf, F. und Lutter, G. (2003): Gene therapy in cardiac surgery: intramyocardial injection of naked plasmid DNA for chronic myocardial ischemia, *Eur J Cardiothorac Surg* (Band 24), Nr. 5, Seite 785-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14583313
- [222] Furth, P. A.; Shamay, A. und Hennighausen, L. (1995): Gene transfer into mammalian cells by jet injection, *Hybridoma* (Band 14), Nr. 2, Seite 149-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7590772
- [223] Smith, L. R.; Wloch, M. K.; Ye, M.; Reyes, L. R.; Boutsaboualoy, S.; Dunne, C. E.; Chaplin, J. A.; Rusalov, D.; Rolland, A. P.; Fisher, C. L.; Al-Ibrahim, M. S.; Kabongo, M. L.; Steigbigel, R.; Belshe, R. B.; Kitt, E. R.; Chu, A. H. und Moss, R. B. (2010): Phase 1 clinical trials of the safety and immunogenicity of adjuvanted plasmid DNA vaccines encoding influenza A virus H5 hemagglutinin, *Vaccine* (Band 28), Nr. 13, Seite 2565-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20117262
- [224] Wu, A.; Zeng, Q.; Kang, T. H.; Peng, S.; Roosinovich, E.; Pai, S. I. und Hung, C. F. (2011): Innovative DNA vaccine for human papillomavirus (HPV)-associated head and neck cancer, *Gene Ther* (Band 18), Nr. 3, Seite 304-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20981112
- [225] Schramm-Baxter, J. und Mitragotri, S. (2004): Needle-free jet injections: dependence of jet penetration and dispersion in the skin on jet power, *J Control Release* (Band 97), Nr. 3, Seite 527-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15212884
- [226] Reddy, P. S.; Ganesh, S. und Yu, D. C. (2006): Enhanced gene transfer and oncolysis of head and neck cancer and melanoma cells by fiber chimeric oncolytic adenoviruses, *Clin Cancer Res* (Band 12), Nr. 9, Seite 2869-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16675583
- [227] Hickman, M. A.; Malone, R. W.; Lehmann-Bruinsma, K.; Sih, T. R.; Knoell, D.; Szoka, F. C.; Walzem, R.; Carlson, D. M. und Powell, J. S. (1994): Gene expression following direct injection of DNA into liver, *Hum Gene Ther* (Band 5), Nr. 12, Seite 1477-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7711140
- [228] Kawase, A.; Nomura, T.; Yasuda, K.; Kobayashi, N.; Hashida, M. und Takakura, Y. (2003): Disposition and gene expression characteristics in solid tumors and skeletal muscle after direct injection of naked plasmid DNA in mice, *J Pharm Sci* (Band 92), Nr. 6, Seite 1295-304. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12761818
- [229] Walther, W.; Stein, U.; Fichtner, I.; Kobelt, D.; Aumann, J.; Arlt, F. und Schlag, P. M. (2005): Nonviral jet-injection gene transfer for efficient in vivo cytosine deaminase suicide gene therapy of colon carcinoma, *Mol Ther* (Band 12), Nr. 6, Seite 1176-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16202659

- [230] Walther, W.; Arlt, F.; Fichtner, I.; Aumann, J.; Stein, U. und Schlag, P. M. (2007): Heat-inducible in vivo gene therapy of colon carcinoma by human *mdr1* promoter-regulated tumor necrosis factor- α expression, *Mol Cancer Ther* (Band 6), Nr. 1, Seite 236-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17237282
- [231] Shergold, O. A.; Fleck, N. A. und King, T. S. (2006): The penetration of a soft solid by a liquid jet, with application to the administration of a needle-free injection, *J Biomech* (Band 39), Nr. 14, Seite 2593-602. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16277987
- [232] Baxter, J. und Mitragotri, S. (2006): Needle-free liquid jet injections: mechanisms and applications, *Expert Rev Med Devices* (Band 3), Nr. 5, Seite 565-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17064242
- [233] Monck, M. A.; Mori, A.; Lee, D.; Tam, P.; Wheeler, J. J.; Cullis, P. R. und Scherrer, P. (2000): Stabilized plasmid-lipid particles: pharmacokinetics and plasmid delivery to distal tumors following intravenous injection, *J Drug Target* (Band 7), Nr. 6, Seite 439-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10758914
- [234] Morishita, R.; Aoki, M.; Hashiya, N.; Makino, H.; Yamasaki, K.; Azuma, J.; Sawa, Y.; Matsuda, H.; Kaneda, Y. und Ogihara, T. (2004): Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease, *Hypertension* (Band 44), Nr. 2, Seite 203-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15238569
- [235] Powell, R. J.; Simons, M.; Mendelsohn, F. O.; Daniel, G.; Henry, T. D.; Koga, M.; Morishita, R. und Annex, B. H. (2008): Results of a double-blind, placebo-controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia, *Circulation* (Band 118), Nr. 1, Seite 58-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18559703
- [236] Matsuki, A.; Yamamoto, S.; Nakagami, H.; Aoki, M.; Tamai, K.; Matsumoto, K.; Nakamura, T.; Ogihara, T.; Kaneda, Y. und Morishita, R. (2004): No influence of tumor growth by intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid DNA: safety evaluation of therapeutic angiogenesis gene therapy in mice, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 315), Nr. 1, Seite 59-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15013425
- [237] Kay, M. A. (2011): State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead, *Nat Rev Genet* (Band 12), Nr. 5, Seite 316-28. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21468099
- [238] Gottesman, M. M. (2003): Cancer gene therapy: an awkward adolescence, *Cancer Gene Ther* (Band 10), Nr. 7, Seite 501-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12833130

- [239] Edelstein, Michael (2011): Gene Therapy Clinical Trial Worldwide, John Wiley & Sons Ltd., 2011, Aug., 06/2011, 05.08.2011, URL: <http://www.abedia.com/wiley/index.html>
- [240] Lopez-Fuertes, L.; Perez-Jimenez, E.; Vila-Coro, A. J.; Sack, F.; Moreno, S.; Konig, S. A.; Junghans, C.; Wittig, B.; Timon, M. und Esteban, M. (2002): DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against Leishmania major infection in mice, Vaccine (Band 21), Nr. 3-4, Seite 247-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12450700
- [241] Magder, S.; Neculcea, J.; Neculcea, V. und Sladek, R. (2006): Lipopolysaccharide and TNF-alpha produce very similar changes in gene expression in human endothelial cells, J Vasc Res (Band 43), Nr. 5, Seite 447-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16921252
- [242] Angrisano, T.; Pero, R.; Peluso, S.; Keller, S.; Sacchetti, S.; Bruni, C. B.; Chiariotti, L. und Lembo, F. (2010): LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes, BMC Microbiol (Band 10), Seite 172. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20546607
- [243] Schakowski, F.; Gorschluter, M.; Buttgereit, P.; Marten, A.; Lilienfeld-Toal, M. V.; Junghans, C.; Schroff, M.; Konig-Merediz, S. A.; Ziske, C.; Strehl, J.; Sauerbruch, T.; Wittig, B. und Schmidt-Wolf, I. G. (2007): Minimal size MIDGE vectors improve transgene expression in vivo, In Vivo (Band 21), Nr. 1, Seite 17-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17354609
- [244] Chen, Z. Y.; He, C. Y.; Ehrhardt, A. und Kay, M. A. (2003): Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo, Mol Ther (Band 8), Nr. 3, Seite 495-500. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12946323
- [245] van Hall, T.; van de Rhee, N. E.; Schoenberger, S. P.; Vierboom, M. P.; Verreck, F. A.; Melief, C. J. und Offringa, R. (1998): Cryptic open reading frames in plasmid vector backbone sequences can provide highly immunogenic cytotoxic T-lymphocyte epitopes, Cancer Res (Band 58), Nr. 14, Seite 3087-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9679975
- [246] Riu, E.; Chen, Z. Y.; Xu, H.; He, C. Y. und Kay, M. A. (2007): Histone modifications are associated with the persistence or silencing of vector-mediated transgene expression in vivo, Mol Ther (Band 15), Nr. 7, Seite 1348-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17457320
- [247] Chen, Z. Y.; Riu, E.; He, C. Y.; Xu, H. und Kay, M. A. (2008): Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation, Mol Ther (Band 16), Nr. 3, Seite 548-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18253155

- [248] Garbe, C. (2007): Malignes Melanom der Haut ICD-10: C43, AWMF, 09/2007, 08/2010, URL:
http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-024_S1_Malignes_Melanom_der_Haut_09-2007_04-2010_in_UEberarbeitung.pdf
- [249] Beutler, B. A.; Milsark, I. W. und Cerami, A. (1985): Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo, J Immunol (Band 135), Nr. 6, Seite 3972-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2999236
- [250] Aderka, D.; Sorkine, P.; Abu-Abid, S.; Lev, D.; Setton, A.; Cope, A. P.; Wallach, D. und Klausner, J. (1998): Shedding kinetics of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors after systemic TNF leaking during isolated limb perfusion. Relevance to the pathophysiology of septic shock, J Clin Invest (Band 101), Nr. 3, Seite 650-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9449699
- [251] Licht, T.; Lubbert, M.; Martens, C.; Bross, K. J.; Fiebig, H. H.; Mertelsmann, R. und Herrmann, F. (1995): Modulation of vindesine and doxorubicin resistance in multidrug-resistant pleural mesothelioma cells by tumor necrosis factor-alpha, Cytokines Mol Ther (Band 1), Nr. 2, Seite 123-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9384669
- [252] Belizario, J. E.; Tilly, J. L. und Sherwood, S. W. (1993): Caffeine potentiates the lethality of tumour necrosis factor in cancer cells, Br J Cancer (Band 67), Nr. 6, Seite 1229-35. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8512808
- [253] Xu, J.; Zhou, J. Y. und Wu, G. S. (2006): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is required for tumor necrosis factor alpha-mediated sensitization of human breast cancer cells to chemotherapy, Cancer Res (Band 66), Nr. 20, Seite 10092-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17047073
- [254] Jung, M.; Dimtchev, A.; Velena, A. und Dritschilo, A. (2011): Combining radiation therapy with interstitial radiation-inducible TNF-alpha expression for locoregional cancer treatment, Cancer Gene Ther (Band 18), Nr. 3, Seite 189-95. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21052099
- [255] Stein, U. und Walther, W. (1998): Cytokine-mediated reversal of multidrug resistance, Cytotechnology (Band 27), Nr. 1-3, Seite 271-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19002798
- [256] Lejeune, F. J.; Ruegg, C. und Lienard, D. (1998): Clinical applications of TNF-alpha in cancer, Curr Opin Immunol (Band 10), Nr. 5, Seite 573-80. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9794839

- [257] Walther, W.; Stein, U. und Pfeil, D. (1995): Gene transfer of human TNF alpha into glioblastoma cells permits modulation of mdr1 expression and potentiation of chemosensitivity, *Int J Cancer* (Band 61), Nr. 6, Seite 832-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7790119
- [258] Mocellin, S.; Rossi, C. R.; Pilati, P. und Nitti, D. (2005): Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy, *Cytokine Growth Factor Rev* (Band 16), Nr. 1, Seite 35-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15733831
- [259] Wang, X.; Ju, W.; Renouard, J.; Aden, J.; Belinsky, S. A. und Lin, Y. (2006): 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin synergistically potentiates tumor necrosis factor-induced lung cancer cell death by blocking the nuclear factor-kappaB pathway, *Cancer Res* (Band 66), Nr. 2, Seite 1089-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16424045
- [260] Zhang, S.; Lin, Z. N.; Yang, C. F.; Shi, X.; Ong, C. N. und Shen, H. M. (2004): Suppressed NF-kappaB and sustained JNK activation contribute to the sensitization effect of parthenolide to TNF-alpha-induced apoptosis in human cancer cells, *Carcinogenesis* (Band 25), Nr. 11, Seite 2191-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15256485
- [261] Algeciras-Schimnich, A.; Griffith, T. S.; Lynch, D. H. und Paya, C. V. (1999): Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis, *J Immunol* (Band 162), Nr. 9, Seite 5205-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10227994
- [262] Xiao, C.; Yang, B. F.; Song, J. H.; Schulman, H.; Li, L. und Hao, C. (2005): Inhibition of CaMKII-mediated c-FLIP expression sensitizes malignant melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis, *Exp Cell Res* (Band 304), Nr. 1, Seite 244-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15707589
- [263] Kirchhoff, S.; Muller, W. W.; Krueger, A.; Schmitz, I. und Krammer, P. H. (2000): TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity, *J Immunol* (Band 165), Nr. 11, Seite 6293-300. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11086065
- [264] Sayers, T. J.; Brooks, A. D.; Koh, C. Y.; Ma, W.; Seki, N.; Raziuddin, A.; Blazar, B. R.; Zhang, X.; Elliott, P. J. und Murphy, W. J. (2003): The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP, *Blood* (Band 102), Nr. 1, Seite 303-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12637321
- [265] Merighi, S.; Mirandola, P.; Varani, K.; Gessi, S.; Capitani, S.; Leung, E.; Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A. und Borea, P. A. (2003): Pyrazolotriazolopyrimidine derivatives sensitize melanoma cells to the chemotherapeutic drugs: taxol and vindesine, *Biochem Pharmacol* (Band 66), Nr. 5, Seite 739-48. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12948854

- [266] Irmeler, M.; Thome, M.; Hahne, M.; Schneider, P.; Hofmann, K.; Steiner, V.; Bodmer, J. L.; Schroter, M.; Burns, K.; Mattmann, C.; Rimoldi, D.; French, L. E. und Tschopp, J. (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP, *Nature* (Band 388), Nr. 6638, Seite 190-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9217161
- [267] Chatterjee, D.; Schmitz, I.; Krueger, A.; Yeung, K.; Kirchhoff, S.; Krammer, P. H.; Peter, M. E.; Wyche, J. H. und Pantazis, P. (2001): Induction of apoptosis in 9-nitrocamptothecin-treated DU145 human prostate carcinoma cells correlates with de novo synthesis of CD95 and CD95 ligand and down-regulation of c-FLIP(short), *Cancer Res* (Band 61), Nr. 19, Seite 7148-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11585748
- [268] Davis, H. L.; McCluskie, M. J.; Gerin, J. L. und Purcell, R. H. (1996): DNA vaccine for hepatitis B: evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 14, Seite 7213-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8692971
- [269] Sheets, R. L.; Stein, J.; Manetz, T. S.; Duffy, C.; Nason, M.; Andrews, C.; Kong, W. P.; Nabel, G. J. und Gomez, P. L. (2006): Biodistribution of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar, without integration, despite differing plasmid backbones or gene inserts, *Toxicol Sci* (Band 91), Nr. 2, Seite 610-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16569729
- [270] Dean, D. A. (2005): Nonviral gene transfer to skeletal, smooth, and cardiac muscle in living animals, *Am J Physiol Cell Physiol* (Band 289), Nr. 2, Seite C233-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16002623
- [271] Cappelletti, M.; Zampaglione, I.; Rizzuto, G.; Ciliberto, G.; La Monica, N. und Fattori, E. (2003): Gene electro-transfer improves transduction by modifying the fate of intramuscular DNA, *J Gene Med* (Band 5), Nr. 4, Seite 324-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12692866
- [272] Brave, A.; Gudmundsdottir, L.; Sandstrom, E.; Haller, B. K.; Hallengard, D.; Maltais, A. K.; King, A. D.; Stout, R. R.; Blomberg, P.; Hoglund, U.; Hejdeman, B.; Biberfeld, G. und Wahren, B. (2010): Biodistribution, persistence and lack of integration of a multigene HIV vaccine delivered by needle-free intradermal injection and electroporation, *Vaccine* (Band 28), Nr. 51, Seite 8203-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20951666
- [273] Bonvalot, S. und Gronchi, A. (2011): ILP and RT: the study that will never be, *Ann Surg Oncol* (Band 18), Nr. 2, Seite 303-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21161726

- [274] Lienard, D.; Eggermont, A. M.; Schraffordt Koops, H.; Kroon, B. B.; Rosenkaimer, F.; Autier, P. und Lejeune, F. J. (1994): Isolated perfusion of the limb with high-dose tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interferon-gamma (IFN-gamma) and melphalan for melanoma stage III. Results of a multi-centre pilot study, *Melanoma Res* (Band 4 Suppl 1), Seite 21-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8038591
- [275] Williams, D. A. (2008): Sleeping beauty vector system moves toward human trials in the United States, *Mol Ther* (Band 16), Nr. 9, Seite 1515-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18725873
- [276] Izsvak, Z. und Ivics, Z. (2004): Sleeping beauty transposition: biology and applications for molecular therapy, *Mol Ther* (Band 9), Nr. 2, Seite 147-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14759798
- [277] Huang, X.; Guo, H.; Tammanna, S.; Jung, Y. C.; Mellgren, E.; Bassi, P.; Cao, Q.; Tu, Z. J.; Kim, Y. C.; Ekker, S. C.; Wu, X.; Wang, S. M. und Zhou, X. (2010): Gene transfer efficiency and genome-wide integration profiling of Sleeping Beauty, Tol2, and piggyBac transposons in human primary T cells, *Mol Ther* (Band 18), Nr. 10, Seite 1803-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20606646
- [278] Zayed, H.; Izsvak, Z.; Walisko, O. und Ivics, Z. (2004): Development of hyperactive sleeping beauty transposon vectors by mutational analysis, *Mol Ther* (Band 9), Nr. 2, Seite 292-304. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14759813
- [279] Ivics, Z.; Katzer, A.; Stuwe, E. E.; Fiedler, D.; Knespel, S. und Izsvak, Z. (2007): Targeted Sleeping Beauty transposition in human cells, *Mol Ther* (Band 15), Nr. 6, Seite 1137-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17426709
- [280] Al-Dosari, M. S. und Gao, X. (2009): Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress, *AAPS J* (Band 11), Nr. 4, Seite 671-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19834816
- [281] Cemazar, M.; Golzio, M.; Sersa, G.; Escoffre, J. M.; Coer, A.; Vidic, S. und Teissie, J. (2011): Hyaluronidase and collagenase increase the transfection efficiency of gene electrotransfer in different murine tumors, *Hum Gene Ther*. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21797718

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 25.10.2011

Dennis Kobelt

Publikationen

Kongressteilnahmen

XIXth Annual ESGCT Congress 2011
Brighton, UK, 27. - 31. 10. 2011

GfV Workshop Viral Vectors & Gene Therapy
Köln, 12. - 13. 9. 2011

International AEK Cancer Congress
Düsseldorf, 16. - 18. 3. 2011

Deutscher Krebskongress 2010
Berlin, 24. - 27. 2. 2010

1st Cancer Day, Charité Comprehensive Cancer Center
Berlin, 6. 10. 2009

20th European Student's Conference
Berlin, 4. - 6. 10. 2009

7th Workshop Viral Vectors & Gene Therapy
Köln, 31. 8. - 2. 9. 2009

15th International AEK Cancer Congress
Berlin, 18. - 20. 3. 2009

18th European Student's Conference
Berlin, 7. - 11. 10. 2007

Kursteilnahmen

Cologne Summer School: Innate and Adaptive Immune System: Tool and Challenge for Gene Therapy
Köln, 12. - 15. 9. 2011

Cologne Summer School: Vector Development and Gene Therapy
Köln, 2. - 4. 9. 2009

Originalartikel

Kobelt D, Schleef M, Schmeer M, Aumann J, Walther W. Employment of Minicircle-DNA for improved gene transfer and transgene expression. **Anal Biochem.** **2011**: submitted

Walther W, Petkov S, Kuvardina ON, Aumann J, **Kobelt D**, Fichtner I, Lemm M, Piontek J, Blasig IE, Stein U, Schlag PM. Novel Clostridium perfringens enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. **Gene Ther.** **2011**: Epub ahead of print

Sack U, Walther W, Scudiero D, Selby M, **Kobelt D**, Lemm M, Fichtner I, Schlag P M, Shoemaker R H, Stein U. Novel effect of antihelminthic Niclosamide on S100A4-mediated metastatic progression in colon cancer. **J Natl Cancer Inst.** **103**: 1018-1036, 2011

Kobelt D, Aumann J, Fichtner I, Stein U, Schlag PM, Walther W. Activation of the CMV-IE promoter by hyperthermia in vitro and in vivo: biphasic heat induction of cytosine deaminase suicide gene expression. **Mol. Biotechnol.** **46**: 197-205, 2010

Walther W, Siegel R, **Kobelt D**, Knösel T, Dietel M, Bembenek A, Aumann J, Schleef M, Baier R, Stein U, Schlag PM. Nonviral intratumoral jet-injection gene transfer in metastatic melanoma and breast cancer: results of phase I clinical trial. **Clin. Cancer Res.** **14**: 7545-7553, 2008

Siegel R, **Kobelt D**, Knösel T, Stein U, Schlag PM, Walther W. Local nonviral intratumoral jet-injection gene transfer in metastatic melanoma and breast cancer: results of a phase I trial. **Chirurg. Forum.** **37**: 131-132, 2008

Siegel R, Stein U, **Kobelt D**, Aumann J, Schlag PM, Walther W. Early results of a phase-I-clinical trial of nonviral gene transfer by jet-injection into cutaneous lesions of metastatic breast cancer and in-transit lesions of metastatic melanoma. **Chirurg. Forum** **36**: 441-443, 2007.

Bandapalli OR, Geheeb M, **Kobelt D**, Kuehnle K, Elezkurtaj S, Herrmann J, Gressner AM, Weiskirchen R, Beule D, Blüthgen N, Herzel H, Franke C, Brand K. Global analysis of host tissue gene expression in the invasive front of colorectal liver metastases. **Int. J. Cancer.** **118**: 74-89, 2006

Walther W, Stein U, Fichtner I, **Kobelt D**, Aumann J, Arlt F, Schlag PM. Nonviral jet-injection gene transfer for efficient in vivo cytosine deaminase suicide gene therapy of colon carcinoma. **Mol. Ther.** **12**: 1176-84, 2005

Poster und veröffentlichte Posterbeiträge

Kobelt D, Aumann J, Schmidt M, Schroff M, Fichtner I, Schlag PM, Walther W. Nonviral MIDGE-vector based TNF-alpha gene transfer for in vitro and in vivo chemosensitization of malignant melanoma 19th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), Brighton, UK, 27. - 31. 10. 2011
Hum. Gene Ther. in press

Kobelt D, Aumann J, Schmidt M, Schroff M, Fichtner I, Schlag PM, Walther W. Mechanism of improved chemosensitization in the application of the non viral MIDGE vector. 8th Workshop Viral Vectors & Gene Therapy, Köln, 12. - 13. 9. 20011

Walther W, **Kobelt D**, Aumann J, Fichtner I, Schmidt M, Schlag PM. Chemosensitization of melanoma by use of the minimalistic nonviral MIDGE expression system for improved TNF-alpha expression in vitro and in vivo. 102. Meeting der "American Association for Cancer Research", Orlando, FL, USA, 2. - 6. 4 2011
Proc. Am. Ass. Cancer Res. **52**: 1297, 2011

Kobelt D, Schmidt M, Aumann J, Schlag PM, Walther W. Employment of the MIDGE vector system for improved chemosensitization by cancer gene therapy. International AEK Cancer Congress, Düsseldorf, Germany, 16. - 18. 3. 2011

Walther W, **Kobelt D**, Aumann J, Fichtner I, Schmidt M, Schlag PM. Use of the minimalistic nonviral MIDGE expression system for improved in vitro and in vivo transfer 18th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), Milan, Italy, 22.-25. 10 2010
Hum. Gene Ther. **21**: 1408, 2010

Walther W, Petkov S, Bölling ON, **Kobelt D**, Aumann J, Stein U, Schlag PM. Nonviral approach for targeted cancer gene therapy using the *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). The 15th World Congress on Advances in Oncology, 13th International Symposium on Molecular Medicine, Loutraki, Greece, 7. - 9. 10. 2010
Int. J. Mol. Med. **26**: 241, 2010

Stein U, Sack U, **Kobelt D**, Kelch I, Fichtner I, Walther W, Schlag PM. Targeting MACC1: In vivo imaging of distant metastases reduction by MACC1-shRNA in human colon cancer Xenografts. 101st Meeting "American Association for Cancer Research", Washinton, DC, USA, 17. - 21. 4. 2010

Proc. Am. Ass. Cancer Res. 51: 2258, 2010

Kobelt D, Schmidt M, Aumann J, Fichtner I, Schlag PM, Walther W. Employment of the minimalistic MIDGE vector for improved nonviral cancer gene therapy. 29th Deutscher Krebskongress,

Berlin, 24. - 27. 2. 2010

Onkologie 33, Suppl. 2: 152, 2010

Stein U, Arlt F, Walther W, Sack U, **Kobelt D**, Kelch I, Fichtner I, Birchmeier W, Schlag PM. Targeting the newly identified metastasis predictor MACC1 for reduction of colon cancer Metastasis. 29th Deutscher Krebskongress, Berlin, Germany, 24. - 27. 2. 2010

Onkologie 33, Suppl. 2: 61, 2010

Petkov S, Bölling O, **Kobelt D**, Aumann J, Stein U, Schlag PM, Walther W. Novel tumor-targeted suicide gene therapy employing the *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). 29th Deutscher Krebskongress, Berlin, Germany, 24. - 27. 2. 2010

Onkologie 33, Suppl. 2: 148, 2010

Walther W, **Kobelt D**, Siegel R, Aumann J, Stein U, Schlag PM. Nonviral gene transfer for treatment of cancer. 14th World Congress on Advances in Oncology, 12th International Symposium on Molecular Medicine, Loutraki, Greece, 15. - 17. 10. 2009

Int. J. Mol. Med. 24, Suppl. 1: 236, 2009

Kobelt D, Schmidt M, Aumann J, Schlag PM, Walther W. Use of in vivo imaging for analysis of improved nonviral MIDGE-vector based gene transfer. 1st Cancer Day, Charité Comprehensive Cancer Center, Berlin, Germany, 6. 10. 2009

Kobelt D, Stein U, Schmidt M, Aumann J, Schlag PM, Walther W. Use of a minimalistic vector system for improved nonviral cancer gene therapy. 20. European Student's Conference, Berlin, 4. - 6. 10. 2009.

Eur. J. Med. Res. 14, Suppl. II: 139, 2009

Petkov S, Bölling O, Aumann J, **Kobelt D**, Stein U, Schlag PM, Walther W. Tumor-specific suicide gene therapy using the *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). 20. European Student's Conference, Berlin, 4. - 6. 10. 2009.

Eur. J. Med. Res. 14, Suppl. II: 139, 2009

Pichorner A, Sack U, **Kobelt D**, Arlt F, Smith J, Walther W, Schlag PM, Stein U. In vivo imaging of colon cancer metastasis in mice: impact of a newly identified gene MACC1. 20. European Student's Conference, Berlin, 4. - 6. 10. 2009.

Eur. J. Med. Res. 14, Suppl. II: 140, 2009

Kobelt D, Schmidt M, Aumann J, Fichtner I, Walther W. Use of MIDGE vector based gene transfer for optimized nonviral cancer gene therapy. 7th Workshop Viral Vectors & Gene Therapy, Köln,

31. 8. - 2. 9. 2009

Walther W, **Kobelt D**, Aumann J, Schlag PM. Improved transfer efficiency and transgene expression in vitro and in vivo using the minimalistic nonviral MIDGE expression system. 100. Meeting der „American Association for Cancer Research“, Denver, CO, USA, 18. - 22. 4. 2009

Proc. Am. Ass. Cancer Res. 50: 3788, 2009

Kobelt D, Stein U, Schmidt M, Aumann J, Schlag PM, Walther W. Use of a minimalistic vector system for improved nonviral cancer gene therapy. 15. International AEK Cancer Congress, Berlin, 18. - 20. 3. 2009

Walther W, **Kobelt D**, Siegel R, Knösel T, Dietel M, Stein U, Schlag PM. Phase I clinical gene transfer trial for nonviral jet-injection of naked DNA in patients with metastases from melanoma and from breast cancer. 15. International AEK Cancer Congress, Berlin, 18. - 20. 3. 2009

Walther W, **Kobelt D**, Aumann J, Stein U. Minicircle technology for improved nonviral gene transfer. 2nd International Workshop on Minicircle-DNA. Bielefeld, Germany, 7. - 9. 5. 2008

Walther W, Fichtner I, **Kobelt D**, Siegel R, Schlag PM, Stein U. Nonviral gene transfer for cancer gene therapy. 11. International Symposium on Xenotransplantation (DAX), Berlin, Germany, 6. 5. 2008

Xenotransplantation 15: 297, 2008.

Walther W, Siegel R, **Kobelt D**, Aumann J, Stein U, Schlag PM. Nonviral jet-injection gene transfer in patients with in-transit metastases from melanoma and cutaneous metastases from breast cancer: results of a phase I clinical trial. 99. Meeting der „American Association for Cancer Research“, San Diego, CA, USA, 12. - 16. 4. 2008

Proc. Am. Ass. Cancer Res. 49: 1396, 2008

Walther W, Siegel R, **Kobelt D**, Aumann J, Knösel T, Dietel M, Stein U, Schlag PM. Nonviral jet-injection phase I clinical trial for local gene transfer into metastases from melanoma and breast cancer. 28. Deutscher Krebskongress, Berlin, Germany, 20. - 23. 2. 2008

Onkologie 31, Suppl. 1: 99, 2008

Walther W, Siegel R, **Kobelt D**, Aumann J, Stein U, Schlag PM. Phase I trial of nonviral jet-injection gene transfer in in transit metastases from melanoma and skin metastases from breast cancer. 18. ESGCT-Meeting, Rotterdam Netherlands, 27. - 31. 10. 2007

Hum. Gene Ther. 18: 994, P1, 2007

Kobelt D, Aumann J, Bölling O, Fichtner I, Lemm M, Stein U, Schlag PM, Walther W. Heat inducibility of the human cytomegalovirus (CMV) immediate-early promoter: identification of possible mechanism. 18. European Student's Conference, Berlin, 2007

Eur. J. Med. Res. 12, Suppl. IV: 21, 2007

Bölling O, **Kobelt D**, Aumann J, Schlag PM, Walther W. Clostridium perfringens enterotoxin (CPE): a new tumor-specific suicide gene for cancer gene therapy. 18. European Student's Conference, Berlin, 7. - 11. 10. 2007

Eur. J. Med. Res. 12, Suppl. IV: 21, 2007

Walther W, Stein U, **Kobelt D**, Siegel R, Schlag PM. Nonviral jet-injection technology for efficient in vivo cancer gene therapy. 14. ESGT Annual Congress, Athen, Griechenland, 9. - 12. 11. 2006

Walther W, Stein U, **Kobelt D**, Aumann J, Schlag PM. The use of nonviral jet-injection technology for cancer gene therapy. 27. Deutscher Krebskongress, Berlin, 22. - 26. 3. 2006

Patent

Walther W, **Kobelt D**, Schmidt M, Schlag PM.

"Use of a linear DNA expression construct with covalently closed ends"

PCT Patentanmeldung: 8. 9. 2011

Anmeldenummer: PCT/EP2011/065569

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Dr. h.c. Schlag und PD Dr. W. Walther für die Möglichkeit bedanken, in ihrem Labor dieses Thema zu bearbeiten. Besonders Herr PD Dr. Walther hat mich zu jeder Zeit während der Entstehung dieser Arbeit mit vollem Einsatz unterstützt. Ich bin ihnen sehr dankbar, dass ich auf dem Gebiet der Gentherapie auch an der Durchführung einer klinischen Studie mitarbeiten durfte. Ich hoffe, dass diese Arbeit einen Beitrag zur Fortführung der nicht-viralen Gentherapie für die Behandlung solider Tumore leistet.

Ich danke Prof. Dr. W. Uckert für die Übernahme der universitätsinternen Betreuung dieser Arbeit.

Allen aktuellen und früheren Mitarbeitern der AG Walther gehört ebenfalls mein Dank für Ihre Unterstützung. Besonders erwähnen möchte ich J. Aumann. Sie hat mich häufig technisch unterstützt und stand mir mit Rat und vor allem Tat zur Seite.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. U. Stein und ihrer Arbeitsgruppe bedanken. Ich konnte mich immer auf ihre Unterstützung verlassen. Trotz ihrer eigenen Arbeitsgruppe, konnte ich jederzeit auch mit ihr meine Fragen und Probleme erörtern. Auch möchte ich Dr. U. Sack und F. Schmid danken. Sie haben mir mit kritischen Hinweisen und sehr guten Diskussionen sehr geholfen. Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. F. Siegel, die während ihrer Promotion jederzeit bereit war, mir über die Durststrecken einer solchen Arbeit zu helfen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern bedanken. Dr. M. Schleef und Dr. M. Schmeer von der PlasmidFactory und Dr. M. Schroff und M. Schmidt von Mologen haben die für diese Arbeit benötigten minimalistischen Vektoren zur Verfügung gestellt. Allen beteiligten Mitarbeitern der Charité und der nun leider geschlossenen Robert-Rössle-Klinik gehört mein Dank, dazu gehören Prof. Dr. M. Dietel und seine Mitarbeiter, Dr. R. Siegel, Dr. A. Bembenek und Dr. T. Knösel. Frau A. Dräger und Herr S. Sander haben Teile der klinischen Dokumentation übernommen. Sie haben alle maßgeblich zum Gelingen der klinischen Studie beigetragen, bei der auch ich einen Teil meiner Arbeit einbringen durfte. Dr. Z. Ivics hat uns die Plasmide für das Sleeping Beauty Transposon/Transposase System zur Verfügung gestellt.

Natürlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung und Motivation wäre diese Arbeit nicht entstanden.